UNIVERSITE DE MONTPELLIER
FACULTE DE PHARMACIE N° 259

LES VARIATIONS
de quelques constituants azotés du SÉRUM SANGUIN
(Étude du complexe lipo-protéïque)

THESE

Présentée et publiquement soutenue
devant la Faculté de Pharmacie de Montpellier
le 13 juillet 1937

PAR

NGUYÊN-TRUNG HUY
LICENCIÉ ÈS SCIENCES NATURELLES

Pour obtenir le Diplôme de Docteur de l'Université
(Mention Pharmacie)

MM.

Jury — M. MOUSSERON, professeur. *Président.*
A. ASTRUC, professeur, Doyen.
E. CANALS, professeur, — *Assesseurs.*

MONTPELLIER
IMPRIMERIE DE LA PRESSE
Rue Jardin-Martel

1937

LES VARIATIONS
DE QUELQUES CONSTITUANTS AZOTES
DU SERUM SANGUIN

(Etude du complexe lipo-proteïque)

UNIVERSITE DE MONTPELLIER
FACULTE DE PHARMACIE N° 259

LES VARIATIONS
de quelques constituants azotés du SÉRUM SANGUIN
(Étude du complexe lipo-protéïque)

THESE

Présentée et publiquement soutenue
devant la Faculté de Pharmacie de Montpellier
le juillet 1937

PAR

NGUYÊN-TRUNG HUY

LICENCIÉ ÈS SCIENCES NATURELLES

Pour obtenir le Diplôme de Docteur de l'Université
(Mention Pharmacie)

MM.

Jury — M. MOUSSERON, professeur. *Président.*
A. ASTRUC, professeur, Doyen.
E. CANALS, professeur, — *Assesseurs.*

MONTPELLIER
IMPRIMERIE DE LA PRESSE
Rue Jardin-Martel

1937

Faculté de Pharmacie de Montpellier

ADMINISTRATION

MM. A. ASTRUC (O ✻, I. P. ✿) .. *Doyen*
A. JUILLET (I.P. ✿) ..... *Assesseur.*
LEBLAYE (A. ✿) ..... *Secrétaire.*

PROFESSEURS

MM. A. ASTRUC (O. ✻, I. P. ✿) .. *Pharmacie galénique et industrielle.*
C. HOLLANDE (I. P. ✿) .... *Zoologie et Microbiologie.*
A. JUILLET (I. P. ✿) ..... *Botanique et Matière médicale.*
A. FAUCON (O. ✻, I. P. ✿, ✶ C. ✠, G. O. ✠) ..... *Pharmacie chimique.*
E. CANALS (I. P. ✿) ..... *Physique.*
M. MOUSSERON ..... *Chimie organique.*
P. JAULMES, Chargé du Cours *Chimie analytique et toxicologie.*
E. CANALS (I.P. ✿), Ch. d. c. *Chimie minérale.*

DOYEN HONORAIRE

G. MASSOL (✻, I. P. ✿)

PROFESSEUR HONORAIRE

MM. F. JADIN (O ✻, I. P. ✿),
Doyen hon. de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

CHARGES DE COURS COMPLEMENTAIRES ET AUXILIAIRES

MM. A. ASTRUC (O ✻, I. P. ✿) .. *Hydrologie.*
C. HOLLANDE (I. P. ✿) .. *Zoologie.*
A. JUILLET (I. P. ✿) ..... *Botanique.*
A. FAUCON (O ✻, I. P. ✿, ✶ C. ✠, G. O. ✠) ..... *Fonctions en chimie organique.*
M. MOUSSERON ..... *Chimie biologique.*
P. JAULMES ..... *Toxicologie.*
MOYE, Doy. hon. Fac. Droit (✻, I.P. ✿) ..... *Législation pharmaceutique.*

AGREGE

P. CASTEL (A. ✿) ..... Chargé d'Agrégation.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. L. FARRE (I. P. ✿) ..... *Chimie et Pharmacie.*
DAUBIAN-DELISLE (✻, IP. ✿) *Physique.*
SUSPLUGAS ..... *Histoire naturelle.*

Nota. — La Faculté de Pharmacie n'accepte la responsabilité d'aucune des opinions émises par les candidats dans les Thèses ou Synthèses qui lui sont présentées.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

A LA MEMOIRE DE MON PERE

DOC-PHU-SU

CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

« *Heureux l'homme à qui Dieu donne une sainte mère !* »

LAMARTINE.

A MA MERE

Ce faible témoignage de mon amour filial et de ma reconnaissance.

A MON FRERE JEAN-BAPTISTE

A LA MEMOIRE DE MA SŒUR ALICE

H. H.

A MONSIEUR F. HERMITTE

CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

En témoignage de mon affection et de ma reconnaissance.

A TOUS LES MIENS

A TOUS MES AMIS

H. H.

À MON MAITRE

MONSIEUR LE PROFESSEUR M. MOUSSERON

PROFESSEUR DE CHIMIE ORGANIQUE ET BIOLOGIQUE

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE

En témoignage de mon admiration et de ma vive gratitude.

À MONSIEUR LE PROFESSEUR A. ASTRUC

DOYEN DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE

PROFESSEUR DE PHARMACIE GALENIQUE ET INDUSTRIELLE

CORRESPONDANT NATIONAL DE L'ACADEMIE DE MEDECINE

OFFICIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

Mes hommages respectueux.

À MONSIEUR LE PROFESSEUR E. CANALS

PROFESSEUR DE PHYSIQUE A LA FACULTÉ DE PHARMACIE

Mes hommages respectueux.

H. H.

AVANT-PROPOS

Avant de franchir ce dernier stade de notre vie d'étudiant, il nous est très agréable d'adresser à tous nos Maîtres de la Faculté de Pharmacie l'expression de notre sincère attachement et de notre profonde reconnaissance. Nous emporterons dans notre patrie lointaine le souvenir respectueux de leur accueil bienveillant et de la haute qualité de leur enseignement.

Nous sommes tout particulièrement heureux de témoigner notre vive gratitude et nos remerciements à notre Maître, M. le Professeur MOUSSERON *qui nous a fait le grand honneur de nous accueillir dans son laboratoire et de nous compter parmi ses plus proches élèves. Son exquise bonté et sa délicate indulgence n'ont jamais cessé de nous encourager, de nous guider et de nous suivre pas à pas dans l'élaboration de ce travail. A ses côtés, nous avons pu apprécier toutes les perspectives si séduisantes de la Biochimie moderne. L'enthousiasme scientifique qu'il nous communique est grave et se prolonge à mesure que l'esprit essaye de découvrir des horizons nouveaux. Un grand éducateur disait: « Le plus bel effet que puisse avoir une éducation c'est d'inspirer à l'élève le désir de la refaire ». Cet acte universitaire marquera non seulement la consécration d'une longue scolarité mais encore, — suivant les possibilités que nous réservent les exigences de la vie —, le prélude d'investigations laborieuses dans l'immense champ à peine exploré*

de la vieille pharmacopée sino-annamite au passé millénaire. Avec l'appui et la maîtrise de ses conseils éclairés qui nous sont déjà acquis d'avance, la réalisation de ce désir sera ainsi le plus bel hommage d'admiration et de reconnaissance que nous puissions rendre à son enseignement.

Nous sommes très sensible à la bienveillance paternelle de M. le Doyen ASTRUC *et à l'honneur qu'il nous fait en acceptant de juger ce modeste travail. Qu'il en soit remercié et qu'il veuille bien trouver ici le témoignage de notre profond respect.*

Nous ne saurions oublier la bonté si aimable et les conseils autorisés que nous avons toujours trouvés auprès de M. le Professeur CANALS. *Sa présence dans ce jury de thèse nous honore et nous touche vivement. Nous le prions d'agréer l'hommage de notre sincère gratitude.*

LES VARIATIONS DE QUELQUES CONSTITUANTS AZOTES DU SERUM SANGUIN

(Etude du complexe lipo-protéique)

INTRODUCTION

Depuis ces dernières années, la Biochimie s'est placée sur l'un des premiers plans de l'actualité scientifique à la suite des services très importants qu'elle rend à la Médecine dans le diagnostic et l'étude d'un grand nombre de maladies.

En se dégageant de l'empreinte théologique et métaphysique que lui donnaient pendant fort longtemps les idées vitalistes, la Biologie moderne démontre la nécessité impérieuse de l'interpénétration des Sciences. Son évolution vers les sciences physico-chimiques est ainsi à l'origine de ses progrès. En effet, plus que jamais nous assistons à la faillite de la théorie vitaliste et à l'écroulement de tout un échafaudage de systèmes et d'idées qui s'y rapportent. Les forces métaphysiques ne sauraient plus intervenir dans les *processus* vitaux qui règlent et conditionnent l'existence des êtres animés puisqu'elles apparaissent désormais à nos savants modernes sous la dépendance étroite des lois de la Physique et de la Chimie.

Citons seulement pour mémoire le phénomène de la parthénogénèse expérimentale dû à J. Loeb (1899-1908) et à Delage qui ont pu déterminer, *sans fécondation*, la division et le développement d'ovules ordinaires par

simple action de l'eau de mer additionnée de chlorures métalliques, ou encore par toute autre intervention extérieure tels que le brassage, la piqûre, l'action temporaire d'une température basse ou élevée, l'action du gaz carbonique, de la strychnine, de l'acide chlorhydrique, etc., etc.. (84). Plus près de nous encore, et toujours dans le même ordre d'idées, nous ne pourrions passer sous silence les travaux de Monsieur le Professeur Bataillon et ceux de Carrel, universellement connus. Le problème si angoissant de l'hérédité se tourne encore vers les sciences physico-chimiques pour essayer de trouver sa solution.

Cette évolution si heureuse de la Biologie ouvre ainsi à nos savants une voie pleine de promesses et féconde en succès.

A l'heure actuelle, la Biochimie peut se présenter à nous comme un immense chantier en pleine activité où se révèle à chaque tournant le labeur admirable des chercheurs. On y élabore des travaux d'une extrême variété, on y échafaude des hypothèses et des théories de toutes sortes. Mais hélas! ce chantier reste toujours inachevé. La Nature est très jalouse de ses secrets. A mesure qu'on cherche à en percer le mystère, des inconnues nouvelles se lèvent à l'horizon; et c'est ainsi que l'on songe toujours à embellir ces magnifiques édifices déjà construits qui font l'orgueil de la Science.

Le modeste travail que nous présentons a tout simplement pour but de poser un petit jalon dans ce vaste chantier.

⁂

Macheboeuf et ses élèves ont éclairé sous un jour nouveau l'état physico-chimique des protéïdes. Nous avons essayé d'apporter notre contribution aux résultats remarqua-

bles concernant le complexe lipo-protéïque établi par cet auteur.

Dans un *premier chapitre*, nous montrerons le rôle pathologique et physico-chimique des deux fractions importantes du sérum sanguin, la *Sérine* et la *Globuline*, et des *Lipides* qui leur sont associés. Ce chapitre sera ainsi un aperçu bibliographique de l'ensemble du problème qui nous intéresse.

Dans un *second chapitre*, nous ferons une revue sommaire de toutes les méthodes analytiques sur le dosage des protéïdes du sang.

Puis, après avoir exposé la technique opératoire que nous avons adoptée ainsi que le protocole de nos expériences, un *troisième chapitre* sera consacré à nos recherches personnelles:

1° Sur la Valeur de ce complexe lipo-protéïque chez quelques espèces animales, en même temps que l'étude comparative de nos résultats personnels avec ceux donnes par d'autres auteurs.

2° Sur le Comportement de ce complexe lipo-protéïque du sérum sanguin au cours de la conservation, d'abord à la température du laboratoire, puis à la température de la glacière, vers 2°-3°.

Nous verrons ensuite parallèlement les variations de ce même complexe au cours du chauffage, à 37 degrés et à 56 degrés C. Ces deux températures semblent présenter pour nous un certain intérêt, puisque nous savons d'une part que le pouvoir complémentaire d'un sérum se détruit à 56°

et que d'autre part, les processus vitaux qui s'accomplissent au sein de l'organisme ainsi que l'activité maxima de certaines diastases, en particulier les diastases tissulaires et les diastases digestives, se font à une température voisine de 37° C.

Nous nous efforcerons de tirer ensuite les conclusions qui pourraient se dégager de ces faits expérimentaux.

Dans un autre ordre d'idées, — que nous pouvons pourtant rapprocher dans une certaine mesure du problème des protéïdes —, nous avons étudié l'*Indice-Tyrosine des polypeptides* du sérum, chez quelques espèces animales, selon la méthode préconisée assez récemment par Goiffon.

Nous suivrons ensuite les variations de cet Indice sous l'influence du vieillissement et du chauffage, tout comme pour l'étude du complexe lipo-protéïque.

Enfin, dans une dernière partie, nous établirons les *variations de l'Urée Sanguine*, avec le temps de conservation, à la température du laboratoire et à zéro degré, selon le microdosage classique au Xanthydrol préconisé par L. Cuny et J. Robert. Cependant, cette méthode pèche un peu par sa difficulté de réalisation. Aussi y avons-nous apporté une légère amélioration qui nous permet de faire des dosages aussi rigoureux et aussi précis que possible.

L'ensemble de notre travail peut paraître à première vue assez hétérogène. Il se montrera pourtant plus systématique et plus lié si nous l'examinons avec notre idée directrice, à savoir: les modifications que présentent quelques constituants azotés du sérum sanguin au cours de la conservation et du chauffage.

PREMIERE PARTIE

CHAPITRE PREMIER

APERÇU GENERAL SUR LES PROTEIDES DU SANG

I. — Valeur pathologique du quotient albumineux sanguin

On sait que les albumines du sérum sanguin sont susceptibles d'être fractionnées en deux portions distinctes auxquelles on a donné le nom de sérum-albumine ou « *Sérine* » et de sérum-globulines ou « *Globulines* ». Ces dernières réunissent dans cette appellation quelques sous-fractionnements, entr'autres les *euglobulines* et les *pseudoglobulines*. Pour 100 grammes d'albumines totales, il y a en moyenne 60 à 70 gr. de sérine pour 30 à 40 gr. de globulines [91].

On appelle *quotient albumineux* le rapport $\frac{\text{Sérine}}{\text{Globuline}}$.

Pour un sérum normal, ce rapport est aux environs de 1,5-1,6.

Un changement notable de ce rapport traduirait l'existence de certains états pathologiques.

⁂

Nous passerons sous silence à dessein la Biologie générale des albumines du sérum sanguin et les variations physiologiques de leur taux.

Par contre, leur rôle pathologique dans le diagnostic et l'évolution de quelques maladies nous semble présenter un certain intérêt.

En 1895, Starling [48] montra déjà le rôle physiologique important que jouent les protéïnes dans les échanges de liquide entre le sang et les tissus, dans le maintien de la masse sanguine et dans la régulation de la diurèse.

En 1917, Epstein tira *à priori* une déduction intéressante sur la valeur de la pression osmotique des protéïdes sanguins d'après leur faible teneur dans les cas de néphroses où la tendance en œdèmes est très marquée.

Enfin, vers la même année Govaerts [48] étudia magistralement cette question et préconisa une méthode de mesure de la pression osmotique des protéïnes du sang. Il eut ainsi le mérite d'avoir introduit cette notion de pression osmotique dans l'investigation des maladies où se manifestent les œdèmes. D'après cet auteur, il y aurait un changement de l'équilibre protéïnique du sérum avec abaissement de la tension osmotique par suite de la diminution de « *sérine* » et de l'augmentation de « *globulines* », dans les cas de néphrites hydropigènes, de l'eczéma des nourrissons, de l'insuffisance hépatique, de la cirrhose du foie et en particulier des hydropisies.

Depuis lors, tous les auteurs s'accordent à reconnaître une relation entre l'œdème et la pression osmotique. Il est à souligner que dans ce processus le fibrinogène n'a aucune

action; seul, le taux de sérine et de globulines intervient (Von Farkas) [36].

Les œdèmes brightiques pourraient ainsi fournir un exemple typique. Ces œdèmes sont déterminés par une rupture de l'équilibre entre la tension hydrostatique des capillaires et la pression osmotique des protéïnes; ce qui a pour conséquence immédiate l'établissement d'un courant de liquide du sang vers les espaces interstitiels (Fiessinger [37]).

En dehors de cette notion, beaucoup d'auteurs ont signalé la portée du quotient albumineux lui-même, au cours de certaines maladies.

Dans les *affections hépatiques,* il y aurait une forte altération du quotient albumineux par suite de l'augmentation du taux de globuline du sérum (Gerard [45]) laquelle serait proportionnelle à la gravité de l'atteinte du foie (Filinski [38]). Egalement, dans les *cancers* à la période de cachexie, Lœper [68], Puech [91] et Filinski [38] ont signalé une forte hyperglobulinémie. Mais l'origine et le processus de cette augmentation restent encore obscurs et les auteurs ne sont pas d'accord dans leur interprétation.

De même, l'hyperglobulinémie observée par Puech dans les *tuberculoses évolutives* serait susceptible de présenter un certain intérêt dans le pronostic de cette affection. Achard, Bariety et Codounis [2] confirment les assertions de Puech et constatent une inversion du quotient albumineux chez les tuberculeux pulmonaires fortement atteints. Parallèlement à cette augmentation de la globuline, les albumines totales présentent une hausse notable tandis que la sérine est fortement abaissée dans les formes graves. Par contre, dans les formes torpides avec bon état général, et quelquefois dans les formes évolutives, cette sérine pourrait être normale. Pour ces auteurs, l'influence de la nutri-

tion générale serait la grande cause de la rupture d'équilibre protéïnique chez les tuberculeux. Tout se passe comme si le malade détruisait sa sérine et produisait un excès de globuline. C'est en effet chez les cachectiques que s'observent le plus souvent les variations du quotient albumineux.

La *blennorrhagie*, dans ses différents états, se signale également par un trouble variable du métablisme protido-lipidique; la détermination des rapports $\frac{\text{Sérine}}{\text{Globuline}}$, $\frac{\text{lipides des sérines}}{\text{lipides des globulines}}$ $\frac{\text{lipides totaux}}{\text{protidestotaux}}$ $\frac{\text{cholestérol des sérines}}{\text{cholestérol des globulines}}$ et l'indice lipocytique pourrait fixer les stades et diagnostiquer l'évolution de cette maladie (Sartory, Hufscmitt, Meyer [107]).

En résumé, ce sont les affections rénales, hépatiques, les infections aiguës d'origine microbienne, en particulier la tuberculose, les cancers à la période de cachexie qui provoquent une rupture d'équilibre dans la répartition de la sérine et de la globuline du sang.

Macheboeuf [70-71-72] poussa même plus loin le problème et considéra non seulement le quotient albumineux $\frac{\text{Sérine}}{\text{Globuline}}$, mais encore la proportion de lipides qui leur sont respectivement associés d'après certaines liaisons physico-chimiques dont la constitution structurale reste à l'heure actuelle à l'état d'hypothèses et demande de plus amples éclaircissements. Le complexe lipo-protéïque baptisé par cet auteur peut donner des indications intéressantes dans certains cas pathologiques. Ainsi la *néphrose lipoïdique*, affec-

tion caractérisée par un métabolisme exagéré des graisses dont on retrouve une notable quantité dans le sang, se présente avec une nette rupture d'équilibre du système lipo-protéïdique. Cette rupture se traduit par les modifications des propriétés physico-chimiques des protéïdes et par une augmentation considérable de la teneur en graisses associées à la sérine. Cet utile renseignement nous fournira de la sorte un moyen pratique pour poser le diagnostic et suivre l'évolution de cette maladie.

Plus récemment, Cueni [23] étudia en 1934 le comportement de ce complexe lipo-protéïdique au cours de certaines affections cutanées. Il a constaté, dans le *psoriasis* un déséquilibre du rapport $\frac{\text{sérine}}{\text{globuline}}$, une augmentation des acides gras et des phosphatides et un trouble du rapport lipocytique. Par ailleurs, dans la *dystrophie graisseuse de la cornée*, le métabolisme de tous les constituants lipoïdiques s'accroît alors que celui du système protéïque est normal.

La *lipomatose* ne révèle qu'un déséquilibre du rapport $\frac{\text{lipides des albumines}}{\text{lipides des globulines}}$.

Enfin, il nous reste à signaler la forte modification du métabolisme lipidique dans la *paraketose*, tandis que les troubles de la lipémie ne se manifestent uniquement que pour les acides gras.

Voilà à l'heure actuelle, l'état de nos connaissances sur les indications que fournit l'étude du quotient albumineux et du système lipo-protéïque au cours de certaines maladies.

Mais le sujet est loin d'être épuisé. De nouveaux problèmes se posent déjà et attendent leur solution. Ainsi dans la

Syphilis, la répartition de la sérine et des globulines demeure encore un point obscur. Les auteurs qui se sont occupés de cette question, entr'autres Rowe [102], Bircher et Mac-Farland [9], Bory et Guerithault [11], Puech [91], Noguchi, sont en désaccord. Il serait intéressant de reprendre ce travail, avec les techniques d'analyse nouvellement préconisées on a signalé et reconnu l'inexactitude des méthodes de dosage par réfractométrie et par viscosimétrie, surtout lorsque le sérum est riche en lipides — et d'étudier parallèlement la répartition des *lipides* associés à la *sérine* et à la *globuline* dans le sérum d'un malade syphilitique. Il s'agit de chercher la corrélation qui existerait entre l'augmentation — incontestée par quelques auteurs — de la teneur en *globuline* et le rôle important joué par celle-ci dans la réaction de Wassermann, comme nous le verrons plus loin. En suivant d'autre part la composition du complexe lipo-protéïque au cours d'un traitement antisyphilitique, peut-être arriverait-on à élucider un peu le problème de la sigma-réaction.

*
**

II. — Modifications d'ordre physico-chimique du serum au cours des sero-reactions

Certaines maladies d'origine microbienne exercent une influence profonde sur l'état physico-chimique du sérum sanguin. L'attention d'un grand nombre d'auteurs s'est arrêtée en particulier sur les sérums syphilitiques.

E. Peyre [85] signale les modifications de la structure

micellaire du sérum de malades atteints de syphilis.

Depuis lors, la réaction classique de Wassermann garde toujours un côté mystérieux et insaisissable, car on ne saurait plus admettre cette réaction comme une simple opposition de deux antagonistes: *antigène-anticorps*. Une intervention physico-chimique est admise désormais et toutes les recherches des savants s'orientent dans ce sens. Les travaux de Yamanouchi et de Levaditi s'accordent avec ceux de Porges, Meiniche-Vernes, Sachs-Georgi pour reconnaître que le sérum syphilitique présente une « *floculation* » toute spéciale vis-à-vis de certaines suspensions colloïdales. Et c'est ainsi qu'on fait entrer en jeu le caractère « *labile* » des globulines [91].

Doures et Pansini ont pu transformer les réactions négatives en réactions positives par simple vieillissement du sérum de quelques jours. Breton [15] signale la diminution du pouvoir floculant d'un sérum tuberculeux avec le temps, ainsi que la réaction de Vernes positive observée dans le sérum d'un individu sain après un certain temps de conservation.

En 1918, Bory [10] montra que dans la sigma-réaction il existe une modification quantitative des albumines du sérum et plus particulièrement des « *globulines* ». Il réussit même à obtenir, *en présence de l'antigène*, des réactions positives en remplaçant le sérum syphilitique par une solution de globulines dans l'eau physiologique. Mieux encore, il obtint toute la gamme de l'échelle de Vernes en faisant des dilutions qui renferment des quantités croissantes de globulines. La réaction de Wassermann révèlerait donc un trouble de l'équilibre des albumines, et lorsque l'excès relatif des globulines dépasse un certain taux, on aurait un caractère spécifique de cette affection chez l'homme.

Kapsenberg [61] vint en 1921 confirmer le point de vue de

Bory et montra le rôle très important de la *globuline* dans la réaction de Wassermann. Cet auteur signala, avec un grand nombre d'expériences à l'appui, que toutes les *globulines* provenant des sérums positifs donnent également une réaction de Wassermann positif. La *globuline* d'un sérum positif possède donc une particularité toute spéciale. Elle est la seule substance qu'on pourrait mettre en cause dans la réaction de Wassermann parce que l'*albumine* de ce même sérum positif, débarrassée *complètement* de globulines, donne toujours un résultat de Wassermann négatif.

Quant aux sérums négatifs, leur *albumine* réagit toujours négativement tandis que leur *globuline*, bien que réagissant en règle générale négativement, présente encore quelques résultats positifs plus ou moins marqués. La cause de ces oscillations nous échappe. Aussi, les conclusions de l'auteur en ce qui concerne la réaction que présente la globuline d'un sérum négatif restent encore à l'état d'hypothèses.

Dans le même ordre d'idées, on avait également entrepris l'étude de la répartition respective de la *sérine* et de la *globuline* dans l'alexine. Ainsi par simple barbottage de gaz carbonique dans un sérum dilué dans de l'eau distillée, on arrive à scinder l'alexine en deux fractions, l'une est formée de *CO^2-globulines*, tandis que l'autre contient la totalité des *albumines*. Ces deux fractions sont inactives séparément, mais reprennent leur *pouvoir alexinique* lorsqu'elles sont réunies. Il y aurait un chaînon central formé par les globulines et un chaînon latéral servant de substratum à la sérine. La réunion de ces deux chaînons représenterait alors le *pouvoir complémentaire* du sérum.

Certains auteurs conçoivent cette alexine comme une substance unique pouvant se scinder facilement. Bronfenbrenner et Noguchi prétendent que l'alexine ne se scinde

nullement dans les procédés employés; elle serait simplement rendu inactive parceque la concentration de l'ion-hydrogène se trouve déplacée par leurs interventions. Pour Gengou au contraire, ces deux fractions d'alexine seraient distinctes dans le sérum. Tage-Kemp [109] se rallie à cette dernière conception. Il a pu démontrer en effet, dans le liquide d'un œdème de stase expérimentalement provoqué dans l'oreille d'un lapin, d'une part l'absence d'alexine et d'autre part l'existence, par rapport à la quantité d'albumine, d'une quantité de globuline moindre que dans le sérum. Par conséquent, la répartition de sérine et de globuline entre le chaînon central et le chaînon latéral de l'alexine est ici modifié. Au contraire, dans le liquide d'un œdème inflammatoire on trouve une quantité notable d'alexine.

Une autre question se pose. Comment se comporte l'activité du complément au cours de la conservation et sous l'influence de la température?

A — 15°, le complément pourrait être maintenu actif pendant plusieurs mois, alors qu'à la température ordinaire le pouvoir complémentaire demeure fixe pendant cinq jours environ, puis baisse progressivement (Thompson et Ronchese [99]).

Enfin, Auguste [6], vient de montrer dans une publication toute récente que la fraction des « *globulines labiles* » qui seraient constituées en particulier par les *euglobulines* et les *lipoprotéïnes phosphorées* et *cholestérinées* exerce un pouvoir inhibant néfaste qui s'oppose au pouvoir fixateur des éléments contenus dans le reste d'un sérum syphilitique. On s'en débarrasse, — dans un sérum préalablement chauffé à 56° —, par simple précipitation par l'acide chlorhydrique; dans la portion non-précipitable par l'acide chlorhydrique, la réaction de Wassermann serait beaucoup plus sensible. Le pouvoir fixateur spécifique de cette fraction est supérieur ou au moins égal à celui du sérum entier, syphi-

litique ou non, alors que son pouvoir anticomplémentaire est nettement inférieur. Ainsi, apparaît encore davantage le rôle prépondérant de la *globuline* qui porte en elle la totalité des éléments susceptibles de différencier un sérum syphilitique d'un sérum non-syphilitique par la réaction de WASSERMANN.

On conçoit l'intérêt et l'importance d'une nouvelle voie de recherches qui s'ouvre devant ce faisceau de constatations dont nous venons d'avoir un rapide aperçu. Il s'agit d'étudier les rôles respectifs des *euglobulines* et des *lipoprotéïnes* précipitables par l'acide chlorhydrique et de rechercher la répartition des éléments fixateurs et des éléments inhibants entre ces deux fractions du sérum.

III. — Caractères physico-chimiques du systeme lipoproteïque sanguin

A. — *Nature physico-chimique de la Sérine et de la Globuline du sang.*

En tant que colloïdes constituant la base fondamentale de la cellule animale, les matières protéïques furent, pendant fort longtemps, le point de convergence des recherches d'un grand nombre de biologistes et aussi l'objet de controverses passionnantes. L'alliance de la Biologie avec la Physique et la Chimie a encore découvert un horizon tout nouveau, et le problème des protéïdes, malgré sa complexité prend ainsi un aspect des plus séduisants.

Le sang est un matériel de choix pour l'étude des protéïnes; on y retrouve presque tous les constituants biologi-

ques de l'organisme. Son étude théorique pourrait donc avoir une portée pratique dans les laboratoires de chimie clinique.

On sait que les protéïdes sont des *colloïdes électrolytiques amphotères* ayant un *poids moléculaire très élevé* [96]. Mais en dehors de ce caractère spécifique de toutes les matières protéïques, les albumines du sérum sanguin présentent deux fractions importantes dont la nature physico-chimique révèle une complexité remarquable. Ce sont ces espèces chimiques auxquelles nous donnons jusqu'ici les dénominations plus ou moins arbitraires encore de « *sérine* » et de « *globuline* ».

Elle se caractérisent en effet par leur extrême labilité sous l'influence d'un grand nombre de facteurs qui pourraient nous échapper, comme les changements de concentrations et les variables thermodynamiques [104].

Ce système se caractérise en outre par une *réversibilité* étonnante (The Svedberg [104]). Lecomte du Noüy [66] a remarqué par ailleurs que la stabilité des globulines du sérum en particulier, dépend entr'autres facteurs de la concentration des sels. Ainsi, l'addition de chlorure de sodium provoque la dissolution presque complète des globulines, dès que la concentration du sel est ramenée aux environs de 0,33 %. Au-dessous de ce taux, la fragilité du sérum considéré comme complexe en équilibre serait maxima. Cette fragilité est augmentée quand le sérum est porté au-dessus de 55 degrés, alors qu'à 50 degrés aucune variation ne se produit.

Devant ces constatations expérimentales, Obermayer, Goldschmidt et tous les auteurs qui s'intéressent à la question échafaudent des hypothèses aussi ingénieuses les unes que les autres. Sœrensen [104] entr'autres émet une conception fort séduisante. Il admet « l'existence de systèmes de

composants, ces composants seraient des chaînes polypeptidiques formées d'acides aminés réunis par des forces de valence primaire; ce sont les chaînes de valence principale. Ces espèces chimiques élémentaires seraient réunies en des sortes de polymères par des forces de valence secondaire et les différents polymères seraient enfin réunis entr'eux par les mêmes forces. Ces complexes pourraient d'ailleurs contenir d'autres constituants que des polypeptides, tels que des groupements phosphorés ou éventuellement des lipides » [Sandor].

Ainsi apparaît le rôle important des valences résiduelles dans l'explication des propriétés physico-chimiques du système *Sérine-Globuline*. Ces restes de valences, dans bien des cas, fausseraient la détermination du quotient albumineux. Il importe donc de se tenir à des techniques de dosages absolument identiques, surtout lorsqu'on opère par les méthodes chimiques. Les écarts de pH du mlieu au cours du fractionnement protéïdique du sang auront également leur part de responsabilité, comme nous le verrons plus loin.

B. – *Nature physico-chimique des Lipides contenus dans le sérum sanguin.*

On sait que le sérum renferme en solution homogène une quantité non négligebale de graisses. Chez les mammifères on trouve une teneur lipidique variant entre 3 et 8 p. 1.000. Ces lipides sont constitués par un mélange de cholestérides, de phosphatides, de glycérides et de traces de cholestérol libre [104].

Les auteurs qui ont étudié jusqu'ici les protéïdes du sérum ne s'intéressent que secondairement aux lipides ou ne s'en préoccupent que partiellement et incomplètement. Un

travail remarquable dû à Machebœuf [70] est venu heureusement donner à cette question toute sa valeur. Les liaisons physico-chimiques réelles qui unissent les protéïdes et les lipides du sérum ont été ainsi démontrées par cet auteur.

Il constate tout d'abord que la totalité des albumines et pratiquement la totalité des lipides sont précipiés à pH 3,8 en présence d'un excès de sulfate d'ammonium et que l'entraînement des graisses par les protéïdes se fait d'une façon réversible. Il effectue ensuite une série de fractionnements, loin de toute action physique ou chimique brutale, en prenant toujours la neutralité comme point de départ, après redissolution des albumines et des lipides. A partir du septième fractionnement, il découvre l'existence d'un complexe lipo-albuminique bien défini, dont la composition reste toujours constante au cours des précipitations et redissolutions successives. Les lipides ne sont donc pas simplement adsorbés par les protides, comme on le supposait pendant longtemps. Devant ce premier fait acquis avec une rare maîtrise cet auteur ne manque pas de poursuivre le sillage si heureusement tracé. Avec ses élèves il étudie alors le comportement de ce complexe lipo-protéïque vis-à-vis des liquides extractifs éthero-alcooliques.

Ils ont pu ainsi observer que les lipides du sérum résistent assez énergiquement à l'extraction éthérée et marquent de cette façon leur très grande stabilité dans la phase aqueuse (Machebœuf et Wahl [72]). Cette stabilité remarquable se manifeste également en présence des agents précipitants. Tandis que l'extraction éthérée du sérum en présence d'une quantité croissante d'alcool montre une limite *invariable* dans la quantité de lipides extraits. La constance de cette limite d'extraction paraît être sous la dépendance d'une nature différente des diverses liaisons protéïdes-lipides (Sandor [104] [71]).

D'autre part, en faisant l'étude comparative de l'effet tampon de l'albumine du sérum normal et de celui du sérum de malades atteints de néphrose lipoïdique, Machebœuf et Sandor [71] démontrent que « les lipides contenus dans les systèmes lipo-protéïques influent profondément sur les propriétés physico-chimiques des protéïdes. L'effet tampon des protéïdes riches en lipides est en effet augmenté d'une façon considérable par rapport aux protéïdes moins riches en graisses ». De là, on est amené à supposer que les lipides du sérum doivent être liés par des groupements chimiques bien déterminés et qu'ils jouent un certain rôle dans l'ionisation de l'eau. Cette hypothèse devrait se cadrer alors avec les travaux de Govaerts [48]. Dans quelle mesure, en effet, s'exerce l'influence de l'ionisation sur la tension osmotique des colloïdes du sérum et suivant quelle mode d'intervention les graisses jouent-elles dans le métabolisme aqueux de l'organisme? Une relation existerait certainement entre cette question et l'accroissement — signalé par Rabinowitch [92] — de la tension osmotique chez les diabètes lipémiques.

Cependant, à l'heure actuelle, nos connaissances sur la constitution des micelles lipoprotéïques restent encore à l'état d'hypothèses. Ce seraient des micelles ayant une structure physique particulière, caractérisée par une rigidité de constitution et une structure pseudo-cristalline. Ce complexe se montre sous l'apparence d'une union de plusieurs espèces chimiques ayant une stabilité remarquable.

Nous ne saurions passer en revue les hypothèses émises par tous les auteurs qui se penchent sur cette question. La plus récente en date est celle de Machebœuf, basée sur les conceptions de Langmuir. « Les molécules de protéïdes contiennent des fonctions chimiques diverses (amides, amine, acide, alcool, phénol...) présentant toutes des affinités nota-

bles pour l'eau; certaines sont ionisables ou même hydratables. Les protéïdes contiennent en outre des chaînes polyméthyléniques linéaires ou cycliques qui constituent en somme des fonctions « carbures d'hydrogène » n'ont pour l'eau aucune affinité, mais elles en présentent de très vives pour leurs homologues, les chaînes polyméthyléniques des lipides. On peut donc concevoir un ensemble complexe de protéïdes-lipides dans lequel les protéïdes et les lipides seraient unis par l'affinité réciproque de leurs chaînes homologues, tandis que vers le solvant aqueux s'orientent les fonctions hydrophiles. Tout autour de l'ensemble protéïdes-lipides se constituerait une zone d'influence réciproque eau-fonctions hydrophiles. Cette zone protégerait les lipides de l'action dissolvante de l'éther. L'éther parvenant à atteindre les lipides ne les toucherait que par leur partie hydrophile.

Lorsque le déséquilibre du complexe protéïdes-lipides-eau est atteint, les lipides sont rapidement enlevés par l'éther pour lequel ils présentent une grande affinité » (Delage) [31].

Cette conception présente une valeur extrêmement séduisante. Ainsi établi et défini, ce système physico-chimique invariant dans un certain domaine, conserve-t-il toujours le caractère de rigidité et de stabilité qui le caractérise, sous l'influence de certains agents extérieurs, tels que la température et le temps? Le vieillissement donne-t-il naissance à un état de discontinuité? Et s'il en existe un, comment se présente-t-il? Telles sont les questions que nous nous sommes posées. Elles feront l'objet de nos recherches personnelles que nous exposerons dans un autre chapitre.

IV. — Influence du vieillissement et du chauffage sur l'état physico-chimique du serum sanguin

Tout le monde s'accorde à reconnaître qu'un grand nombre de systèmes ou de complexes gardent toute la spécificité de leurs caractères physico-chimiques jusqu'à une certaine limite, mais lorsque cette limite est dépassée ou modifiée en quoi que ce soit, on assiste alors à des possibilités de variations parfois surprenantes.

Buglia et Polimanti [16] avaient déjà signalé en 1906 que la conductivité électrique ainsi que la viscosité augmentent au cours du vieillissement.

Mme Roche et Marquet [98] [74] ont également rassemblé un ensemble de faits très intéressants sur la conservation du sérum à différentes températures (0° ; 37° — et température du laboratoire). Durant la conservation, la sérum-albumine paraît être une protéïne plus stable que la globuline; son état micellaire reste pratiquement invariable. Par contre, la sérum-globuline lui oppose une allure nettement différente: changement de son état micellaire et variation de son poids moléculaire.

Il apparaît encore, dans les mêmes conditions de chauffage et de conservation, une variation des lipides totaux du sérum et une précipitation — sous forme de lipides phosphorés — des lipides associés à l'état de complexe aux protéïnes sériques, ce qui aurait pour effet de rompre l'équilibre du système lipo-protéïque. Il se pourrait ici qu'un processus enzymatique encore inconnu provoque l'altération des phosphatides du sérum et donne naissance à un phospholipide non azoté, semblable à l'acide phosphatidique de

Chibnall et Channon [21], par perte de choline ou de cholamine à partir des lécithines et des céphalines. [Marquet [74].

Par ailleurs, Lecomte du Noüy [66] [19] signale que la *viscosité* décroît suivant une courbe régulière à mesure que l'on soumet le sérum à une température croissante. Cette courbe atteint une valeur minima aux environs de 57°. La viscosité reste alors constante tant que la température se maintient à 56°. Puis à mesure que la température décroît pour revenir à son point de départ, la viscosité décrit alors régulièrement une courbe croissante. Ces deux courbes se superposent et le phénomène est parfaitement *réversible*. Toutefois, ce caractère de réversibilité disparaît lorsque la température s'élève au-dessus de 56°. Au-delà de 60°, apparaît le prélude de la coagulation; les molécules forment une agrégation plus importante et augmentent la grosseur de leurs particules.

L'auteur a fait ressortir d'autre part une remarque très intéressante qui pourrait servir dans la suite à nos propres conclusions expérimentales. Aux environs de 45° et 60° la courbe de viscosité présente parfois des « *fluctuations* » lorsque le sérum est frais, mais lorsque le sérum a été chauffé préalablement à 56° pendant dix minutes, cette irrégularité de la courbe disparaît.

Chalier et Chevallier [20] partage les remarques de Lecomte du Noüy et note de plus que la courbe reste en plateau de 59° à 66°; puis la courbe de viscosité se relève pour tendre rapidement vers l'infini.

Parallèlement, l'*indice de réfraction* diminue aussi quand la température du sérum augmente.

CHAPITRE II

TECHNIQUE DE DOSAGE DES PROTEINES DU SANG

Ces dosages peuvent se porter soit sur les protéïnes totales, soit sur leurs deux fractions principales : la sérum-albumine et la sérum-globuline.

Un grand nombre de techniques ont été proposées. Nous les répartirons en deux groupes :

A. – Méthodes physiques et physico-chimiques.

B. — Méthodes chimiques qui comprennent une méthode Azotimétrique et plusieurs méthodes Pondérales.

*
**

A. — Methodes physiques

On a remarqué que l'indice de réfraction d'un sérum est en relation directe avec sa teneur en albumines totales tandis que seules les globulines paraissent avoir une influence sur sa viscosité. Le dosage de la *sérine* et de la *globuline* d'un sérum se ramèned onc à deux mesures physiques, l'une donnera la valeur de l'indice de réfraction, l'autre donnera celle de la viscosité. [Puech [91].

Les mesures *réfractométriques* se font avec un appareil

de Pulfrich. Des tables spéciales dites « *Tables de Reiss* » permettent de convertir par simple lecture la valeur des indices trouvés en grammes d'albumines par litre.

La *viscosité* se mesure en comparant le rapport du temps nécessaire à l'écoulement d'un sérum à travers un tube capillaire au temps nécessaire à l'écoulement d'une même quantité d'eau distillée dans les mêmes conditions de température et de pression.

Enfin pour connaître le *quotient albumineux* $\frac{\text{Sérine}}{\text{Globuline}}$ on se reporte au tableau de Rohrer; sur les ordonnées on porte le chiffre trouvé au réfractomètre et sur les abscisses le chiffre trouvé par viscosimétrie [91].

Mais cette méthode réfractométrique de Reiss ne donne pas un résultat pleinement satisfaisant. [Guillaumin-Wahl-Mlle Laurencin [52] ainsi que Cristol-Puech-Monnier [29]. Les résultats trouvés sont toujours supérieurs à ceux fournis par les méthodes chimiques. Il y a là une influence certaine du taux des lipides (cas de néphrose lipoïdique) et de la proportion relative des globulines [Achard-Grigault-Codounis [1] [3]. Même chez les sujets normaux, la réfraction spécifique des albumines présente de grands écarts [Starlinger-Spath et Vinands.]

Les perfectionnements de nos procédés actuels doivent donc écarter cette méthode bien qu'elle soit expéditive et commode.

***

La deuxième méthode intéressante à signaler est celle qui utilise la *Dialyse*. Les membranes dont on se sert sont d'origine animale ou végétale. Le type classique de ces membra-

nes est la *vessie de porc* ou le *papier parchemin*. D'autres auteurs utilisent une membrane qui se trouve dans la cavité intérieure des segments de roseaux (*Phragmitis communis*). Quant aux membranes de *collodion*, l'expérience révèle que leur emploi manque de commodité. Enfin une membrane qui paraît se prêter très facilement à la dialyse est celle fournie par l'*amnios de l'homme et des animaux*, préalablement plongé dans l'eau bouillante pendant une minute. Cette opération aurait pour effet de diminuer la porosité de cette membrane [G. Kapsenberg [61]. La dialyse ainsi pratiquée permet une séparation judicieuse de la globuline du sérum et a déjà rendu des services dans les recherches bactériologiques.

D'autrefois, la globuline est préparée à partir d'un agent précipitant chimique: sulfate de sodium, d'ammonium, de magnésium, etc..., et on a recours ensuite à la dialyse pour éliminer les sels qui se trouvent mélangés à cette globuline. [Bory [10].

L. Reines et H. Kohp [94] emploient l'*Electrolyse* pour isoler et doser la globuline du sérum sanguin. Mais il s'agit surtout ici des matières: liparine, novirudine, germanine, acide lysalbinique et protalbinique qui protègent la globuline en l'empêchant de se coaguler durant l'électrolyse du sérum.

D'après W. C. Exton et A. E. Rose [35] la répartition clinique des protéïdes du sang pourrait être étudiée par *Scopométrie* au moyen d'une cellule photoélectrique.

D. M. Greenberg [50] indique une détermination colorimétrique. Après avoir séparé les protéïnes à l'aide du sulfate de sodium, on pourrait évaluer leur taux respectif par *Colorimétrie* en employant le réactif phénolique de Folin.

La *Néphélométrie* fut employée par St-Rusznyak [100] [101] pour déterminer le quotient $\frac{\text{albumine}}{\text{globuline}}$ et le rapport $\frac{\text{firinogène du plasma citraté}}{\text{albumines totales}}$, tandis que Etienne de Nador-Nikititch [82] de son côté signale une microméthode *diaphanométrique* pour doser la globuline dans le liquide céphalo-rachidien. On précipite d'abord la globuline par une solution d'acide phénique à 10: 150 (*Réaction de Pandy*). Une échelle diaphanométrique dont on a déterminé au préalable par azotimétrie la teneur en globulines à l'aide d'un sérum sert de point de comparaison. La lecture se fait simplement par la méthode de Mestrezat [78]. La gamme de cette échelle va de 0 gr. 10 à 1 gr. pour mille de globuline.

Signalons enfin une autre méthode néphélométrique modifiée par Avellar et de Loureiro [7]. Les protéïdes sont ici précipités par le sulfate d'ammonium ou de magnésium dans un milieu *faiblement gélatiné*. La gélatine a pour but de produire un trouble stable en augmentant la viscosité du milieu; ce dernier est amené à un pH voisin du point isoélectrique des protéïdes étudiés par une solution-tampon.

*
**

B. — Methodes chimiques

I. — *Méthode Azotimétrique*

Comme son nom l'indique, cette méthode consiste dans le dosage de l'azote contenu dans la Sérine et la Globuline.

Ayant l'occasion de l'utiliser au cours de nos expériences, nous exposerons plus loin son mode opératoire.

L'Azote est dosé, après *Kjeldahlisation*, au moyen de l'appareil classique de Parnas-Wagner.

Préconisée par Howe [57] cette méthode a été appliquée par d'autres auteurs pour doser la fibrine, la sérine, la globuline, l'azote total et l'azote total non protéïque [G. E. Cullen et Van Slyke [24].

Son principe consiste en un dosage fractionné qui comporte trois temps :

On dose d'abord l'*azote total* du sérum, puis l'*azote total non protéïque* après défécation du sérum par l'acide trichloracétique.

Dans un troisième temps, après avoir séparé sur une autre portion du même sérum la globuline à l'aide d'une solution saturée de sulfate de sodium, on fait un dosage de l'azote sur ce filtrat. Howe signale d'autre part qu'en plus de l'*euglobuline*, il semble y avoir dans le sérum sanguin deux globulines: les pseudo-globulines I et II qui précipitent en totalité respectivement à 17,4 et 21,22 % de sulfate de sodium. Le taux de l'azote appartenant à la sérine est obtenu en retranchant du chiffre d'azote fourni par ce troisième dosage l'azote total non-protéïque. — Quant à la globuline, son taux d'azote est donné par la différence entre l'azote total et l'azote fourni par le troisième dosage (azote protéïque, sans globulines).

On aura ensuite la quantité de *Sérine* et de *Globuline* correspondante en multipliant les chiffres d'azote respectifs par deux coefficients sur lesquels les auteurs sont en désaccord. En effet, le choix de ce coefficient azoté demeure encore incertain et souligne ainsi le manque de précision de cette méthode, reconnu par les uns et non-admis par les autres. Le coefficient azoté des *Globulines* était estimé

d'abord à 6,25; Healy lui attribua la valeur de 6,31; Pettre et Vila [86], celle de 6,95; Noël Fiessinger [37] se tient à un coefficient unique de 6,66 aussi bien pour la Sérine que pour les Globulines. Pour la *Sérine*, le coefficient varie entre 6,50 et 6,62. Guillaumin, Wahl et Mlle Laurencin [52] adoptent la valeur de 6,55.

Quoi qu'il en soit, cette méthode est reconnue supérieure à la méthode réfractométrique. [Cristol, Puech et Monnier [29]. Cependant les résultats qu'elle donne sont toujours légèrement supérieurs à ceux fournis par la méthode pondérale. [Guillaumin.]

II. — Methodes Ponderales

Ici, le choix de l'agent précipitant a fourni une bibliographie assez importante.

L'*Alcool* à basse température serait susceptible de provoquer la séparation des *Globulines* du *Sérum* [Proca [87]. Le précipité obtenu est retenu sur un filtre en papier *Schleicher N°* 590. Seulement, ce procédé n'est valable que pour un *sérum frais*. Les globulines provenant des sérums vieux ne se comportent plus de la même façon et passent à travers le filtre.

L'emploi simultané de l'*Alcool* et de l'*Acétone* fut préconisé ensuite par Kayser [63]. On opère au voisinage du point isoélectrique des protéïnes pour obtenir une pureté parfaite. La séparation de la *Sérine-Globuline* se fait avec du sulfate de magnésium à saturation et le filtrat de sérine est coagulé au voisinage du point isoélectrique par ébullition en présence d'un peu de formol. La quantité de *Globulines* s'obtient en soustrayant des protéïnes totales le poids de *Sérine*.

De leur côté, Mascré et Herbain [75] proposent l'action combinée du *formol* et de l'*alcool* ou de tout autre agent précipitant tels que le sulfate de sodium, de magnésium ou d'ammonium, l'acide trichloracétique, etc... L'addition de formol aurait provoqué, d'après ces auteurs, deux phénomènes associés : d'une part, la formation de « *formol-protéïnes* » ou de « *méthylène-protéïnes* », très différentes des protéïnes initiales en présence des réactifs et susceptibles de produire, d'autre part, une *acidification du milieu,* par action du formol sur les constituants aminés non protéiques du sérum. De cette façon, la précipitation des protéïnes par les sels neutres, l'alcool ou l'acétone peut être plus ou moins influencée.

L'influence du formol est aussi très nette sur la précipitation des matières albuminoïdes du lait. [Bouchara [14.]

Mais d'où vient cette acidification du milieu? Elle n'est que la résultante de l'action du formol sur le sulfate d'ammonium par exemple avec libération d'acide sulfurique. Tandis que Henley [56] donne une toute autre explication en invoquant la diminution progressive de la solubilité des albumines dans la solution de sulfate d'ammonium.

La formation de « *formol-protéïnes* » ne serait ainsi que la transformation des albumines en pseudo-globulines et en englobulines et finalement en albumines de solubilité plus faible.

Pietttre et Vila [86] utilisent encore la précipitation par l'Alcool ou l'Acétone, mais *neutralisent au préalable le sérum* par l'*acide chlorhydrique* ou l'*acide sulfurique*. Cette neutralisation aurait pour effet de transformer les combinaisons protéïques alcalines en complexes acides de solubilité différente.

Le précipité de protéïnes est alors repris par de l'eau distillée; seule la *sérine* passe en solution, à la condition

toutefois que la dose d'acide introduite soit exactement celle correspondante à la séparation. La *sérum-albmuine* plus ou moins mélangée de *globulines* est purifiée par une nouvelle précipitation par l'acétone suivie d'une redissolution dans l'eau saturée de gaz carbonique.

F. de Myttenaere et Bessemans [80] font intervenir d'ailleurs l'action de CO^2. et expriment leurs résultats en « *Sérine* » et « *CO^2-globulines* ».

Merklen, Lebreton et Aduot [79] modifient cette méthode en précipitant d'abord les protéïdes totaux par l'acétone. Après pesée et redissolution de ce précipité, on sépare alors la *globuline* par un courant de CO^2. La solution surnageante ne contient que la *sérine*.

Enfin, Goiffon et Handiquent [46] ont essayé de mesurer les albumines complexes par leur « *erreur de protéïnes* ». Une solution contenant des albumines est amenée, — en présence d'indicateur colorée (*Orangé-Na à* 0,20 *pour mille*) et au moyen de l'acide chlorhydrique, — à la même teinte qu'une solution-témoin. Une courbe d'étalonnage permet ensuite de rapporter l'acide chlorhydrique à la teneur des albumines.

Signalons en passant que S. Matsumura [76] a séparé l'albumine du sérum par le chlorure cuivrique.

Cependant, la méthode pondérale la plus classique à l'heure actuelle par suite de la précision satisfaisante des résultats qu'elle fournit, est celle qui utilise les agents précipitants minéraux très connus: sulfate de sodium (Howe) — sulfate d'ammonium [Machebœuf-Sandor], sulfate de magnésium, etc...

CHAPITRE III

TRAVAUX PERSONNELS SUR LE COMPLEXE LIPO-PROTEIQUE DU SERUM SANGUIN

Notre travail comporte huit parties:

1° Mesure de l'*Azote-Sérine* et de l'*Azote-Globuline* du plasma d'après la méthode de Howe.

2° Dosage pondéral de la « *Sérine-Globuline* » et des *Lipides* associés d'après la méthode de Machebœuf.

3° Etude comparative du quotient albumineux $\frac{\text{Sérine}}{\text{Globuline}}$ obtenu par gravimétrie et du rapport $\frac{\text{Azote-Sérine}}{\text{Azote-Globuline}}$

4° Détermination de la *Tension Osmotique des Protéïnes*, chez quelques espèces animales, d'après la quantité de Sérine et de Globuline obtenue par la méthode pondérale.

5° Etude du complexe lipo-protéïque de Machebœuf, chez

quelques espèces animales, et comparaison de nos résultats avec ceux donnés par d'autres auteurs.

6° Influence du *Vieillissement* sur la constitution du complexe lipo-protéïque.

7° Influence du *Chauffage* sur la constitution du complexe lipo-protéïque.

8° Conclusions.

*
**

I. Mesure de l'azote de la « serine » et de la « globuline» du plasma sanguin suivant la technique de Howe

Nous ne revenons pas sur le principe de cette méthode qui a été exposé par ailleurs. Voici le mode opératoire que nous avons suivi: [N. Fiessinger [37].

D'abord, le sang a été recueilli dans un récipient stérile contenant environ 2 gr. pour mille d'oxalate. A l'arrivée au laboratoire, on procède à la centrifugation et on prélève ensuite le plasma.

Réactifs utilisés :

1° Solution de sulfate de soude *anhydre à* 22 *gr.* 2 %, ce qui correspond à 50 gr. 34 de sel cristallisé.

2° Acide trichloracétique à 20 %.

3° Acide sulfurique concentré pur.

4° Solution de sulfate de cuivre à 5 %.

5° Thymol grossièrement pulvérisé.

6° Solution titrée d'acide sulfurique $\frac{n}{100}$ et $\frac{n}{10}$.

7° Solution titrée de soude $\frac{n}{100}$ et $\frac{n}{10}$

8° Lessive de soude à 40 %.

(Soude pure exempte d'ammoniaque).

9° Solution de Rouge de Méthyle (indicateur).

Remarque. — Le Rouge de Méthyle, colorant acide, ne doit pas être employé sous sa forme commerciale, mais après neutralisation [Moitessier et Roche (A) [81].

1° *Dosage de l'Azote total*

α) *Kjeldahlisation.* — Dans un microkjeldahl, on met 0 cc 5 de plasma oxalaté, 2 cc. d'acide sulfurique concentré, 1 goutte de sulfate de cuivre à 5 % et une petite bille de quartz pour éviter les projections pendant la destruction organique.

Nous n'insisterons pas sur le principe de cette minéralisation ainsi que sur sa réalisation pratique. On trouvera ces renseignements dans tous les traités [Roche] [81]; N. Fiessinger [37]; Fleury [39].

Il est toutefois utile de savoir que la destruction de la matière organique n'est pas nécessairement réalisée quand le milieu s'est décoloré (Roche). Pour notre part, nous avons laissé se poursuivre le chauffage pendant encore cinq bonnes minutes après la décoloration du milieu.

β) *Dosage de l'Ammoniac.* — Lorsque la kjeldahlisation est terminée on dosera l'ammoniac qui se trouvera dans le milieu à l'état de sulfate avec l'appareil de Parnas-Wagner, en prenant toutes les précautions opératoires habituelles

que réclame ce genre de dosage. Dans le cas qui nous occupe, nous avons reçu l'ammoniac dégagé dans 5 cc. d'acide sulfurique $\frac{n}{10}$ et l'excès d'acide est titré avec la soude $\frac{n}{10}$. Certaines fois, cette quantité d'acide est insuffisante; on assiste alors à une brusque décoloration de la solution titrée sulfurique pendant que l'appareil est en marche.

Avant de verser la solution titrée de soude, il est important de chauffer légèrement vers 70° la solution d'acide pour chasser les traces de gaz carbonique qui pourraient fausser le virage.

Quelques gouttes du produit de la kjeldahlisation sont parfois entraînées dans le réfrigérant, soit par absorption, soit par brusque élévation de température. Ce cas se produit surtout lorsque le ballon à distillation qui est la partie essentielle et la plus importante de l'appareil de Parnas-Wagner reçoit une grande quantité de matière à distiller, en disproportion avec sa capacité. Il faut donc laver le kjeldahl avec très peu d'eau de façon à ce que le ballon à distillation du Parnas ne soit rempli qu'à moitié. Mais pour plus de sûreté encore, nous avons adapté à la partie supérieure de ce ballon une petite colonne de Vigreux qui a pour effet de faire retomber les gouttes qui pourraient être entraînées.

Soit donc N_T le chiffre d'azote obtenu dans ce premier dosage, pour 100 cc. de plasma.

2° *Dosage de l'Azote total non-protéïque.* — Il est constitué principalement par l'azote de l'urée, des acides aminés, de la créatine, de la créatinine et de l'acide urique. On le dose dans le filtrat de déprotéinisation trichloracétique du sérum. A 5 cc. de plasma, ajouter 5 cc. d'acide trichloracétique qui précipite les protéïnes. Prélever 2 cc. du filtrat et y

doser l'azote toujours de la même façon, après destruction, au PARNAS-WAGNER.

Ici, l'ammoniac dégagé est reçu dans 5 cc. d'acide sulfurique $\frac{n}{100}$. Comme pour tous ces dosages acidimétriques par la soude, en présence de Rouge de Méthyle comme indicateur, le terme final est marqué par le passage de la coloration orangé au jaune-serin. — Soit N_t le chiffre d'azote trouvé pour 100 cc. de plasma.

Remarques. — La préparation des solutions titrées $\frac{n}{100}$ doit être faite à partir des solutions $\frac{n}{10}$ en ayant soin d'employer de l'eau bi-distillée bouillie.

Il est d'autre part nécessaire, à cause de la précision que réclame ce genre de micro-dosage, de vérifier toujours la pureté des réactifs utilisés ainsi que l'exactitude des solutions titrées. Nous avons fait d'abord, une fois pour toutes, l'essai « *à blanc* » des réactifs utilisés et avant chaque série de dosage, nous contrôlons toujours la correspondance des solutions titrées.

L'essai des réactifs « *à blanc* » se fait exactement dans les mêmes conditions que pour un vrai dosage. On emploie la même quantité d'agents minéralisateurs en remplaçant bien entendu le produit à minéraliser par de l'eau distillée. On opère avec des microburettes graduées au 1/100e de cc.

3° *Dosage de l'Azote appartenant à la Sérine.* — A 0 cc. 5 de plasma, ajouter dans un tube à centrifugation de 30 cc., 15 cc. de sulfate de sodium, un grain de thymol, et laisser 3 heures à l'étuve à 37° pour que les globulines totales précipitent. Filtrer sur filtre sec ou centrifuger.

Puis, sur 5 cc. de filtrat, faire une Kjeldahlisation et doser l'ammoniac comme précédemment. L'ammoniac est reçu dans 10 cc. d'acide sulfurique $\frac{n}{100}$; parfois même 15 cc. sont nécessaires.

Soit N_F le chifre d'azote trouvé pour 100 cc. de plasma

L'Azote appartenant à la Sérine sera donné par la différence : $N_F - N_t$

L'Azote des Globulines est représenté par: $N_T - N_F$

et l'Azote total protéïque : $N_T - N_t$

Le rapport $\frac{N_F - N_t}{N_T - N_F}$ représentera donc le quotient

$$\frac{\text{Azote-Sérine}}{\text{Azote-Globuline}}.$$

II. — Dosage ponderal de la « Serine - Globuline » et des *Lipides* associés d'après la technique de Machebœuf

Opérations préliminaires. — Le sang est recueilli dans un bocal stérile. A l'arrivée au laboratoire on laisse le sérum s'exsuder normalement pendant environ une heure. On le soumet à une double centrifugation. Le sérum destiné au dosage doit être en effet parfaitement *clair*. Tout sérum hémolysé est à rejeter.

Réactifs utilisés :

1° Solution *saturée* et *neutre* de $SO^4 (NH^4)^2$

2° Solution de $SO^4H^2 \frac{n}{5}$

3° Solution de $NH^3 \frac{n}{5}$

4° Alcool à 95°.

5° Ether commercial.

6° Ether parfaitement anhydre (1).

Il faut que la solution de sulfate d'ammonium soit parfaitement saturée et neutre. Environ 250 gr. de sulfate d'ammonium finement pulvérisé sont dissous dans 300 cc. d'eau distillée. La dissolution peut être activée par un bain-marie vers 30°. Agiter longtemps et laisser refroidir. La saturation complète est marquée par le reste d'un excès de sulfate d'ammonium au fond du récipient. Décanter et Filtrer.

La neutralisation de cette solution saturée se fait au moyen de l'*ammoniaque concentré* (quelques gouttes suffisent) jusqu'au virage au bleu verdâtre du *Bleu de Bromothymol;* virage apprécié à la touche.

---

(1) Cet éther est préparé dans une série de sept flacons numérotés: les trois premiers contiennent du carbure de calcium et les quatre autres du sodium filé. L'éther du commerce est mis d'abord dans le premier flacon; après 24 heures de contact, on le décante et on le filtre dans le deuxième flacon, et ainsi de suite. Tous ces flacons sont fermés par des bouchons portant un long tube doublement recourbé en U dans lequel on aura mis un index de mercure.

A. — Dosage de la « Serine » et de la « Globuline »

I. — *Séparation des « Globulines ».*

Le mode opératoire qui va être exposé n'est qu'une « *méthode-standard* » de Sandor [104].

A 10 cc. de sérum clair ajouter, dans un tube à centrifugation de 30 cc., 10 cc. de solution saturée de sulfate d'ammonium. Agiter longtemps avec une petite baguette en verre et laisser la précipitation se poursuivre pendant quinze minutes à froid. Centrifuger ensuite les globulines précipitées. Cette centrifugation est assez laborieuse et réclame un bon quart d'heure à grande vitesse.

Recueillir par décantation le liquide surnageant limpide dans un autre tube à centrifugation de 60 cc. Ce liquide renferme en effet, la totalité de la « *Sérine* » qui n'a pas été touché par le sulfate d'ammonium à demi-saturation.

Le culot de « *globulines* » ainsi formées et séparées est dissous dans 6 cc. 5 d'eau distillée. A cette solution on ajoute 6 cc. 5 de sulfate d'ammonium qui reprécipite les « *globulines* ». Agiter et laisser reposer encore quinze minutes. Cette opération a pour but de purifier les *globulines* en leur débarrassant de la petite quantité de « *sérine* » qui a pu être entraînée au cours de la première précipitation.

On centrifugera encore et ce nouveau culot de centrifugation représentera la totalité des globulines purifiées. Elles seront conservées et traitées ultérieurement.

Quant à l'eau-mère provenant de cette deuxième précipitation, elle sera réunie à la solution albumineuse déjà séparée dans le tube à centrifugation de 60 cc.

II. — *Séparation de la « Sérine ».*

L'ensemble des liqueurs décantées réunies dans le tube à centrifugation de 60 cc. représente la totalité des albumines en solution. On lui ajoute 16 cc. de sulfate d'ammonium, et 6 cc. d'acide sulfurique $\frac{n}{5}$ quand il s'agit d'un sérum de cheval; pour le sérum de mouton ou de lapin, il en faut 6 cc. 5. Agiter et abandonner encore quinze minutes. Dans ces conditions, on a précipité toute la Sérine. Centrifuger alors à grande vitesse et la liqueur surnageante est essayée à la touche avec une solution de *Rouge-Congo*. Il faut qu'on obtienne un début de virage au Violet du Rouge-Congo; ce qui indique que le milieu est à un pH voisin de 3,7-3,8. En effet, Machebœuf a montré que les albumines peuvent être précipitées à peu près quantitativement avec les lipides qui les accompagnent en augmentant la concentration en sulfate d'ammonium, puis en acidifiant jusqu'à pH 3,7-3,8. Quant aux sels minéraux, les sucres, les hydrates de carbone divers, l'urée et d'autres substances du sérum qui souillent primitivement la solution albumineuse, ils restent dans les eaux-mères au cours de cette précipitation.

Ainsi donc, si toutes ces conditions sont réalisées, le culot de centrifugation renferme la totalité de la « Sérine ». Ce culot sera également conservé pour être traité ultérieurement.

Cette méthode « *standard* » préconisée par Sandor a l'avantage d'être rapide et commode. Elle nous a donné par ailleurs des résultats très satisfaisants.

B. — Dosage des Lipides associés aux « Globulines »

Depuis les travaux de Hoppe-Seller, Kumagawa-Suto [64], Grigaut [49], etc... il est bien démontré que l'Ether seul est incapable d'extraire tous les lipides associés aux protéïnes du sang; tandis que l'action combinée de l'Alcool et de l'Ether est reconnue très efficace. La technique que nous allons exposer est basée sur ce principe.

Dans le tube à centrifugation de 30 cc. contenant déjà le culot de globulines, ajouter 4 cc. d'eau distillée. Agiter avec une baguette jusqu'à complète dissolution. Puis, ajouter 20 cc. d'alcool à 95°. On ferme le tube par un bouchon auquel on adapte un long tube de verre effilé à sa partie supérieure.

Il sera alors porté au bain-marie bouillant pendant une demi-heure, pour dénaturer les protéïdes. Ce dispositif a pour effet d'éviter une trop rapide évaporation de l'alcool. D'autre part, deux ou trois anneaux en caoutchouc adaptés près du bouchon permettent au tube à centrifugation de se maintenir dans le bain-marie en se posant sur une planchette en bois percée d'un trou dont le diamètre est légèrement supérieur à celui du tube.

Laisser ensuite refroidir et entraîner le culot ainsi que la liqueur alcoolique restante dans la cartouche de l'appareil de Kumagawa-Suto avec environ 40 cc. d'alcool à 95°. On va alors réaliser l'extraction des lipides dans cet appareil.

L'extraction à l'alcool dure en moyenne trois bonnes heures. Le chauffage doit être réglé modérément pour éviter une trop vive ébullition. Le bec « veilleuse » d'un Bunsen suffit amplement pour ce réglage. Toutes les précautions in-

diquées par Cueni [23] nous semblent superflues; nous n'avons jamais eu, au cours de nos dosages, les ennuis qu'il a signalés. Il faut que le siphonage de l'alcool ne soit pas irrégulier ni trop rapide.

Après ce temps, on recueille le liquide extractif alcoolique dans un ballon de 100-150 cc. Et on remplace cet alcool par une égale quantité d'Ether. L'extraction éthérée se poursuit alors pendant encore une heure.

Pendant ce temps, on distille au bain-marie, la liqueur extractive alcoolique. Le ballon est suivi d'un réfrigérant auquel on adapte un ballon à tubulure latérale destiné à recueillir le liquide qui a distillé. Si la distillation se fait mal, on enroule de coton le réfrigérant ainsi que le col du ballon. — La distillation se poursuit jusqu'à consistance pâteuse.

La liqueur extractive Ethérée est alors versée également dans le même ballon. Elle sera distillée de la même façon. On doit, cela va de soi, rincer au moins deux fois avec un peu d'éther, le ballon du Kumagawa.

L'ensemble des résidus alcooliques et éthérés contenant tous les lipides mélangés à des impuretés, en particulier l'excès de sulfate d'ammonium qui a reprécipité, sera ensuite distillé au vide pour enlever l'alcool et l'eau restant. Une simple trompe à eau suffit pour cette opération. Le ballon sera plongé dans un bain-marie pour activer la distillation. Il faut éviter une trop brusque évaporation au vide surtout lorsqu'on a encore un résidu liquide assez important. Il serait préférable de pousser la première distillation au bain-marie jusqu'à consistance pâteuse ferme avant de passer au vide. L'évaporation dans le vide doit durer environ cinq bonnes minutes.

Dans le ballon refroidi, on versera ensuite 10 à 15 cc. d'*Ether absolument anhydre*. [Cet Ether doit être toujours

conservé sur du sodium filé]. Agiter et filtrer sur Berzelius dégraissé à l'éther avec un entonnoir à filtration rapide au-dessus d'un autre ballon de même capacité qu'on a bien *séché* préalablement. Distiller encore au bain-marie et poursuivre comme précédemment cette distillation au vide pendant encore cinq minutes. Ce résidu sera repris une seconde fois par l'éther *anhydre*. Cette opération s'accompagnera encore d'une distillation et d'un nouveau passage au vide. Enfin ce résidu final qui représente la totalité des lipides associés à la « *globuline* » est de nouveau repris par quelques centimètres cubes d'*éther anhydre*. On transvase cette solution éthérée lipidique dans une fiole de Fourneau dégraissée et tarée, au-dessus d'un entonnoir à filtration rapide. Evidemment, on aura soin de rincer le ballon trois fois avec chaque fois environ 2 cc. d'éther anhydre.

Le papier filtre Berzelius dont on se sert est dégraissé au préalable à l'éther. La fiole de Fourneau est placée ensuite sur une plaque légèrement chaude pour évaporer la plus grosse partie de l'éther. L'évaporation sera poursuivie finalement pendant une heure dans une dessiccateur au vide sulfurique.

Il ne nous reste plus qu'à effectuer une pesée pour avoir le taux des lipides associés à la « *globuline* ».

Remarques. — La filtration de la solution éthérée doit être faite rapidement et avec précaution. En effet, l'évaporation de l'éther peut provoquer une condensation de l'humidité atmosphérique qui se manifestera par un dépôt de quelques gouttelettes d'eau sur le bord de l'entonnoir. Si des traces de sulfate d'ammonium avaient été entraînées, elles pourraient se dissoudre au contact de cette infime quantité d'eau. Le filtrat éthéré lipidique risque ainsi de renfermer toujours le sulfate d'ammonium.

Nous avons pu également observer, comme Cueni [23], lors des filtrations et évaporations successives, une décomposition des lipides, surtout ceux qui sont liés à la « *Sérine* ». Ainsi, la solution éthérée, ordinairement claire, peut devenir trouble.

C. — Dosage des Lipides associés a la « Serine » (1)

Le culot de « *Sérine* » contenu dans le tube à centrifugation de 60 cc. est dissous avec 2 cc. d'ammoniaque $\frac{n}{5}$. Agiter avec une baguette et si la solution n'est pas complète au bout de cinq minutes, ajouter encore 0 cc. 5 d'ammoniaque $\frac{n}{5}$.

Le reste du dosage ne diffère en rien au dosage des lipides associés à la globuline.

Remarques. — Calcul de l' « *Index-lipoalbuminique* »:

Suivant la définition donnée par Machebœuf, c'est le *taux de lipides correspondant à* 100 *gr. de sérines.*

Soit A le poids de sérine et L le poids de lipides correspondants.

L' « *Index-lipoalbuminique* » sera égal à: $\frac{100 \times L}{A}$.

Pour un sang humain normal, ce chiffre est inférieur à 10 et oscille entre 7 et 8.

(1) Nous avons employé dans cet exposé indifféremment le terme de « *Sérine* » ou d'*albumines;* en gardant seulement la dénomination distinctive de « *Globulines* ».

D. — *Dosage pondéral proprement dit de la* « Sérine » *et de la* « Globuline » *dégraissée.*

Après l'extraction des lipides au KUMAGAWA, les cartouches contenant les culots de « sérine » et de « globuline » sont soumises à un abondant *lavage à l'eau bouillante.* On se débarrasse ainsi du grand excès de sulfate d'ammonium qui s'y trouve. Ce lavage doit être poussé jusqu'à ce que l'eau de lavage ne donne plus de trouble de sulfate de baryum avec une solution de chlorure de baryum.

La cartouche est alors mise à l'étuve à 100° pendant environ trois quarts d'heure. Au bout de ce temps, la plus grande partie de l'eau est évaporée et la masse de « *globuline* » ou de « *sérine* » se détache facilement de la cartouche. A l'aide d'un spatule, on vide le contenu dans un petit récipient taré qu'on remet de nouveau à l'étude jusqu'à poids constant. Cette manipulation nous a permis d'éviter le rassemblement peu commode, dans un petit filtre d'Iena taré, la masse de sérine ou de globuline, à l'aide d'un jet d'alcool, comme l'a préconisé MACHEBŒUF.

Remarques. — Toutes nos pesées, aussi bien pour les *lipides* que pour la *sérine-globuline,* ont été faites avec une balance sensible au $\frac{1}{100}$ de milligrammes.

III. — Etude comparative du quotient albumineux $\frac{\text{SERINE}}{\text{GLOBULINE}}$ obtenu par gravimetrie et du rapport $\frac{\text{AZOTE-SERINE}}{\text{AZOTE-GLOBULINE}}$

Grâce à la technique de Howe, nous avons pu déterminer le rapport $\frac{\text{azote-sérine}}{\text{azote-globuline}}$ chez le *Cheval*, le *Bœuf*, la *Vache* et le *Mouton*. Le Sang a été recueilli dans un récipient stérile et la saignée s'est fait à l'abattoir même, immédiatement après la mort de l'animal. Il en est ainsi pour tous nos dosages.

Trois tableaux comparatifs, I, II et III sur lesquels sont consignés les résultats analytiques, vont nous permettre de tirer quelques observations.

Voir Tableaux pages 55, 56, 57.

Il ressort de cet examen que le rapport $\frac{\text{azote-sérine}}{\text{azote-globuline}}$ est *légèrement égal ou toujours supérieur au quotient albumineux* $\frac{\text{sérine}}{\text{globuline}}$ déterminé par la méthode pondérale. Ce qui confirme bien les conclusions antérieures de Guillaumin [52].

Il se pourrait que cette différence soit due à plusieurs causes:

TABLEAU I

Tension Osmotique des Protéines et Relations entre l'Azote-Sérine et l'Azote-Globuline de quelques espèces animales

Résultats exprimés en grammes pour 100 cc. de sérum ou de plasma	CHEVAL	BŒUF	VACHE	MOUTON	PORC	CHAT
N. total : N_T	1 gr. 056 %	1 gr. 182 %	1 gr. 190 %	1 gr. 120 %		
N. protéïque sans globuline : N_F	0,416	0,482	0,570	0,634		
N. total non-protéïque : N_t	0,027	0,027	0,017	0,053		
N. Sérine : $N - N_{F\ t}$	0,389	0,455	0,553	0,581		
N. globuline : $N - N_{T\ F}$	0,640	0,700	0,620	0,486		
Rapport $\frac{\text{N. Sérine}}{\text{N. Globuline}}$	0,61	0,65	0,89	1,20		
Sérine (méthode pondérale)	2 gr. 47 %	3 gr. 00 %	3 gr. 21 %	3 gr. 55 %	3 gr. 35 %	3 gr. 15 %
Globuline (méthode pondérale)	4 gr. 35 %	4 gr. 79 %	3 gr. 93 %	2 gr. 50 %	3 gr. 93 %	1 gr. 60 %
Pression — Sérines	18 cm. 63	22 cm. 62	24 cm. 20	26 cm. 66	25 cm. 26	23 cm. 75
Pression — Globulines	8 cm. 48	9 cm. 34	7 cm. 66	4 cm. 87	7 cm. 66	3 cm. 12
Tension osmotique des Protéïnes	27 cm. 11	31 cm. 96	31 cm. 86	31 cm. 53	32 cm. 92	26 cm. 87

TABLEAU II

Résultats analytiques personnels	Etude du Complexe Lipo-Protéïque chez quelques espèces animales					
Résultats donnés en grammes par litre	CHEVAL	BŒUF	VACHE	PORC	MOUTON	CHAT
Sérine	24,7	30,00	32,10	33,50	35,50	31,50
Globuline	43,5	47,90	39,30	45,60	25,00	16,00
Protéïdes totaux	68,2	77,90	71,40	79,10	60,50	47,50
Rapport $\frac{\text{Sérine}}{\text{Globuline}}$	0,57	0,62	0,82	0,73	1,42	1,98
Lipides associés à la Sérine	3,20	2,80	2,50	2,90	2,00	3,10
Lipides associés à la Gobuline..	1,60	1,30	1,40	1,30	1,20	1,70
Rapport $\frac{\text{Lipides-Sérines}}{\text{Lipides-Globulines}}$	2,00	2,00	1,80	2,10	1,70	1,82
Rapport $\frac{\text{Lipides-Sérines}}{\text{Sérines}}$	0,120	0,097	0,078	0,087	0,056	0,099
Rapport $\frac{\text{Lipides-Globulines}}{\text{Globulines}}$	0,037	0,028	0,038	0,030	0,048	0,106
Index - Lipoalbuminique	12	9,7	7,8	8,7	5,6	9,9

TABLEAU III

Résultats analytiques donnés par d'autres auteurs	HOMME		CHEVAL		MOUTON	CHIEN	LAPIN		RAT	BŒUF
Les chiffres sont exprimés en grammes par litre de sérum	Analyse de Sandor	Analyse de Cueni	Analyse de Sandor	Analyse de Cueni	Analyse de Sandor	Analyse de Sandor	Sandor Analyse de Sandor	Analyse de Hammersten	Analyse de Robertson	Analyse de Hammersten
Sérines	47	45,33	26,80	21,98	40,90	29	39,30	44,30	48	33,3
Globulines	45,6	29,70	39,70	41,35	30,30	65	13,90	17,90	17	41,7
Protéïdes totaux	92,6	75,03	66,50	63,33	81,20	94	53,20	62,20	65	75,00
Rapport $\frac{\text{Sérine}}{\text{Globuline}}$	1,03	1,53	0,68	0.53	1,35	0,45	2,83	2,48	2,82	0,80
Lipides associés à la Sérine	3,60	4,43	3,80	2,90	1,50	3,90	1,65			
Lipides associés à la Globuline	2,30	2,33	2,30	1,55	1,30	0,76	1,60			
Rapport $\frac{\text{Lipides-Sérines}}{\text{Lipides-Globulines}}$	1,57	1,90	1,65	1,94	1,15	5,10	1,03			
Rapport $\frac{\text{Lipides-Sérines}}{\text{Sérines}}$	0,077	0,097	0,140	0,134	0,037	0,140	0,042			
Rapport $\frac{\text{Lipides-Globulines}}{\text{Globulines}}$	0,050	0,078	0,056	0,037	0,042	0,010	0,120			
Index-Lipoalbuminique	7,7	9,7	14	13,4	3,7	14	4,2			

1° La différence de forces entre les agents précipitants employés. La séparation de la globuline par le sulfate de sodium ou d'ammonium, ne serait peut-être pas tout à fait identique et il y aurait lieu de faire intervenir le pH du milieu.

2° Girard [45] a signalé d'autre part que l'âge, l'alimentation, le jeûne, la taille et même le poids peuvent faire varier le quotient albumineux chez les individus d'une même espèce. Chez le Chien en particulier, le rapport $\frac{\text{globuline}}{\text{sérine}}$ peut aller de 2,09 à 1,04, presque du simple au double. A plus forte raison, l'amplitude de cette variation est encore plus accentuée chez des espèces différentes.

IV. Détermination de la tension osmotique des protéïnes

Quant à la Pression osmotique des Protéïnes chez ces animaux, nous l'avons calculée d'après les résultats fournis par la méthode pondérale, en admettant les chiffres de Govaertz à savoir que 1 gr. pour 100 de *sérine* donne une pression de 7 cm. 54 d'eau tandis que la même quantité de *globuline* ne donne plus qu'une pression de 1 cm. 95. La Tension Osmotique des Protéïnes totales sera alors la somme des chiffres fournis par la « sérine » et la « globuline ».

En effet, sauf pour le Mouton, nous avons constaté une inversion du quotient albumineux, c'est-à-dire que ces animaux possèdent par rapport à l'homme beaucoup plus de globuline que de sérine. Dès lors, nous ne pouvons pas employer les coefficients azotés indiqués dans la technique de Howe et calculés pour un sérum humain, pour convertir les

chiffres d'azote trouvés en taux de *sérine* et de *globuline*, [Cf. Tableau I, page 55].

V. — Etude du complexe Lipo-protéïque de Machebœuf chez quelques especes animales et Comparaison de nos resultats avec ceux donnes par d'autres auteurs

Nous avons déterminé la Valeur de ce complexe Lipo-protéïque dans un sérum de *Cheval*, de *Bœuf*, de *Vache*, de *Porc*, de *Mouton* et de *Chat*. On trouvera nos résultats analytiques personnels aux tableaux II et IV. Ces résultats représentent la moyenne de deux ou trois dosages sur des sérums provenant d'individus différents. Dans un but comparatif, le tableau III reproduira les résultats fournis par d'autres auteurs. [Cf. p. 56-57 et 62-63].

A première vue, un indice saillant attire déjà notre attention. Le rapport $\frac{\text{sérine}}{\text{globuline}}$ est nettement l'*inverse* de celui de l'Homme, sauf pour le Chat. [Le Mouton cependant nous a présenté une fois au cours de nos dosages une anomalie fort curieuse avec un quotient $\frac{\text{Sérine}}{\text{Globuline}}$ inversé].

Nous avons pensé tout d'abord que cette anomalie proviendrait du régime alimentaire de l'animal. Le Chat, espèce carnivore, possède ainsi un quotient albumineux se rapprochant de celui de l'homme. Mais les résultats fournis par Sandar, Robertson et Hammerston pour le sérum de

Chien, de *Rat* et de *Lapin* accusent une trop grande discordance avec notre hypothèse. Cette anomalie pourrait s'expliquer dans une certaine mesure, par l'influence de l'âge, du moment de la saignée, etc... (Girard [45]).

Un autre fait important est également à retenir. Malgré la différence des techniques employées, le poids de Sérine garde relativement une fixité étonnante, alors que le taux de Globuline varie considérablement; cette variation, dans certains cas, va même du simple au double. On remarquera ainsi le désaccord de Sandor et de Cueni en ce qui concerne le taux de « *globuline* » dans le sérum humain. En général, nos résultats personnels se rapprochent beaucoup de ceux de Cueni. — Toutefois, cette labilité excessive des Globulines n'influence pas outre mesure le quotient albumineux $\frac{\text{Sérine}}{\text{Globuline}}$. Ce quotient pourra ainsi garder sa valeur dans l'étude de l'évolution de certaines maladies, à condition d'employer toujours la même méthode analytique et de se tenir à des conditions opératoires identiques.

La même remarque est applicable pour la détermination de l'*Index-lipoalbuminique*.

Ces observations nous semblent importantes. En effet, les chiffres lipidiques trouvés par Sandor, sont toujours supérieurs à ceux de Cueni et de Marquet ; tandis que les nôtres se rapprochent de ceux de Cueni. Dans quelle mesure sont-elles valables puisque d'un autre côté Sandor souligne que la teneur en lipides peut varier d'un Cheval à un autre?

VI. — Influence du *Vieillissement* sur la constitution du complexe lipo-protéique

Le Sérum a été conservé en flacons stériles, sans addition d'antiseptique, à la température du laboratoire, dans un endroit frais et aéré pour que la température reste aussi uniforme que possible aux environs de 16-17°, pendant une semaine. Le même sérum a été conservé à la température de la glacière aux environs de 2-3°, pendant le même temps.

Nos résultats analytiques sont mentionnés au tableau IV.

Cf. pages 63-64.

Ici encore l'extrême fixité de la « *Sérine* » est à noter en premier lieu. Le poids de *Globulines*, au contraire, diminue progressivement à mesure que le sérum vieillit ; mais cette variation du taux de « globuline » est beaucoup plus accentuée durant la conservation du Sérum à la température du laboratoire.

Nous tenons à souligner une fois de plus que les termes de « *Sérine* » et de « *Globuline* » ne sont encore que des dénominations arbitraires ; ils ne valent donc relativement que pour les conditions opératoires dans lesquelles nous nous trouvons.

Notre observation se retrouve cependant avec les conclusions de Mme Roche [97] qui a trouvé, au cours du vieillissement, la fixité du poids moléculaire de la sérine et une forte variation de celui de la globuline. D'autre part, le rôle de la globuline dans le pouvoir complémentaire du sérum attire une fois de plus notre attention. En effet, d'un côté nous pouvons constater avec Thompson et Ronchese [99]

que l'activité du complément se maintient pendant plusieurs mois à -15° et pendant cinq jours environ à la température du laboratoire, et de l'autre côté, nos résultats expérimentaux viennent de nous montrer que le taux de globulines n'a varié que très faiblement après une semaine de conservation à la glacière et après trois jours de conservation à la température du laboratoire.

Les Lipides associés à la « *Sérine* » ainsi que l' « *Index-lipoalbuminique* » gardent également une très grande stabilité. Les Lipides associés à la « *Globuline* » semblent rester invariables après le séjour d'une semaine à la glacière, tandis que la conservation du même sérum à la température du laboratoire accuse une légère augmentation de ces mêmes lipides. Que penser de cette rupture d'équilibre du complexe ?

Nous avons pu constater, comme Mme Roche et Marquet que, dans les conditions de nos expériences, après une semaine de conservation, il se forme un dépôt blanchâtre au fond du récipient.

Il se pourrait qu'une partie de ces phospholipides dont la nature a été définie par Marquet [74] s'accroche aux valences résiduelles des « *Globulines labiles* » avant de se précipiter au fond du récipient, durant la conservation, alors que les liaisons stables de la « *Sérine rigide* » restent inviolables. En d'autres termes, la fixation des phosphatides altérés du sérum, au cours du vieillissement et même du chauffage, ne se fait que dans un sens, uniquement sur les valences coordinatives globuliniques à cause de leur instabilité.

Evidemment, ce n'est qu'une hypothèse provisoire que nous émettons sous toute réserve pour expliquer cette rupture d'équilibre du complexe « *lipo-globulinique* » du sérum au cours du vieillissement à la température du laboratoire.

TAB[illegible] IV

SERUM DE CHEVAL. — VARIATIONS DU COMP[illegible] IPO-PROTEIQUE AVEC LA T° ET LE TEMPS

Résultats exprimés en grammes par litre	Sérum frais 5 heures après le prélèvement		72 h. après le prélèvement T° du Labor. 16-17°	7 jou[illegible] T°	[illegible]rès le prélèvement [illegible]boratoire 16-17°	Sérum maintenu à 37° pendant 2 h. 10 minutes	7 jours après le prélèvement T° de la Glac. : 2°	Sérum maintenu à 56° pendant 2 h. 10 minutes	Sérum conservé à la glacière : 2° pendant 7 jours puis porté à 56° pend. 2 heures
Sérum	N° 1	N° 2	N° 1	N°	N° 2	N° 2	N° 2	N° 2	N° 2
Sérine	25,70	»	27,10	2[illegible]	»	»	»	»	»
	»	29,50	»		29,50	27,60	30,50	6,00	8,00
Globuline	48,50	»	41,00	3[illegible]	»	»	»	»	»
	»	56,80	»		49,50	45,10	52,00	70,50	72,00
Protéïdes totaux	74,20	»	68,10	62[illegible]	»	»	»	»	»
	»	86,30	»	»	79,00	72,70	82,50	76,50	80,00
Rapport Sérine / Globuline	0,530	»	0,670	0,[illegible]	»	»	»	»	»
	»	0,520	»	»	0,600	0,600	0,590	0,086	0,110
Lipides associés à la Globuline	1,60	»	1,80	2,2[illegible]	»	»	»	»	»
	»	1,20	»	»	1,80	1,50	1,30	1,20	1,20
Lipides associés à la Sérine	2,60	»	2,50	2,7[illegible]	»	»	»	»	»
	»	2,40	»	»	2,30	2,80	2,50	2,40	2,10
Rapport Lipides-Sérine / Lipides-Globuline	1,62	»	1,40	1,2[illegible]	»	»	»	»	»
	»	1,90	»	»	1,30	1,87	1,90	1,90	1,80
Rapport Lipides-Sérine / Sérine	0,100	»	0,092	0,105	»	»	»	»	»
	»	0,080	»	»	0,082	0,102	0,080	0,400	0,260
Rapport Lipides-Globuline / Globuline	0,033	»	0,043	0,058	»	»	»	»	»
	»	0,021	»	»	0,036	0,034	0,025	0,017	0,016
Index lipo-albuminique	10	»	9,2	10,5	»	»	»	»	»
	»	8	»	»	8,2	10,2	8	40	26

VII. — Influence du chauffage sur la constitution du complexe lipo-protéïque

Le sérum recueilli en flacon stérile a été porté à l'étuve à 37° et au bain-marie à 56° pendant 2 heures 10 minutes. Le point de comparaison est donné par un sérum frais qui nous servira en même temps de témoin. Afin d'avoir un point de contrôle, le même sérum qui a séjourné une semaine à la glacière a été également porté ensuite à 56° pendant deux heures, cette fois-ci. [Tableau IV, pages 62-63].

Après ce court séjour à l'étuve à 37°, le sérum se présente encore avec une parfaite limpidité. L'analyse nous révèle que le taux de « *sérine* » reste relativement invariable. Par contre, il y a légère diminution du taux de « *globuline* » et augmentation de la teneur des lipides associés, aussi bien à la « sérine » qu'à la « globuline ». Cette rupture de l'équilibre lipoprotéïque devrait être en rapport avec la variation du taux des lipides totaux signalée par Marquet [74]. Seulement, comme les lipides associés à la « *Sérine* » ont également varié ici, nous ne pouvons plus supposer la fixation des phosphatides modifiés par le chauffage à 37° *seulement* sur les valences des fractions protéiniques labiles. Ne serait-il pas possible d'expliquer cette discordance dans l'hypothèse que nous avons émise plus haut, en nous rapprochant du phénomène de « *fluctuations* », signalé par Lecomte du Nouy [66] aux environs de 45°? [*Cf.* page 31].

Ce rapprochement est tentant parce qu'alors il nous permet de supposer que la température de 37° est très apte à provoquer le déséquilibre de certains systèmes physico-chimiques du sérum.

Que se passe-t-il maintenant à la température de destruction de l'alexine? — Après un séjour de 2 heures à 56°, l'équilibre protéïno-lipidique est nettement rompu.

Le sérum se trouble légèrement et une forte centrifugation n'arrive pas à l'éclaircir. Nous assistons à une très forte diminution du taux de « *sérine* » et à une augmentation considérable de la teneur en « *globuline* ». Cependant, les *lipides associés n'ont pas varié.*

Ainsi, la destruction de l'Alexine se traduit-elle tout simplement par un net déséquilibre du rapport $\frac{\text{Sérine}}{\text{Globuline}}$? Ce résultat serait à rapprocher du travail d'Auguste [6] sur l'augmentation de la sensibilité de la réaction de Wassermann par élimination préalable, sur un sérum chauffé à 56°, des *euglobulines* et des *lipoprotéïnes.* Quelle est l'influence de la labilité des protéïnes sur le pouvoir complémentaire du sérum et quel est dans ce cas, le rôle respectif des lipides ?

Ces questions mériteraient d'être éclaircies.

*
**

VIII. — Conclusions

1° Il existe une certaine stabilité dans le taux de « *Sérine* » du sérum sanguin, chez différents individus de la même

espèce, quelle que soit la méthode analytique employée. Le taux de « Globulines », au contraire, est assez variable. Cependant, le rapport $\frac{\text{Sérine}}{\text{Globuline}}$ ne varie que dans des limites assez étroites. Ce quotient albumineux peut donc garder encore sa valeur pathologique parfois très utile pour suivre l'évolution de certaines maladies. Toutefois, il est important de rappeler qu'à l'heure actuelle, les termes de « *Sérine* » et de « *Globuline* » ne sont encore que des dénominations assez arbitraires, susceptibles donc de présenter des variations suivant les procédés analytiques employés. Il convient, dans l'estimation clinique du quotient albumineux, de se tenir toujours dans des conditions opératoires identiques.

2° La stabilité de l' « *Index-lipoalbuminique* » n'est pas constante chez les individus de la même espèce. Sa valeur pathologique reste donc incertaine; sauf pour les cas où le métabolisme des graisses est nettement exagéré.

3° Au cours du Vieillissement et du Chauffage, la « *Sérine* » se montre encore avec une rigidité remarquable alors que les « *Globulines* » lui opposent une grande labilité. Cette observation rejoint ainsi le renseignement de Mme Roche et Marquet sur les variations de l'état micellaire des globulines dans les sérums vieillis et chauffés. D'autre part, cette labilité des « globulines » pourrait peut-être expliquer dans une certaine mesure l'*instabilité* de la réaction de floculation sur du sérum vieilli, signalée par Dourès-Pansini ainsi que Breton [15].

4° Cette rupture d'équilibre du complexe lipo-protéique de Machebœuf serait attribuable en grande partie aux valences coordinatives labiles des globulines. Les lipides s'y

accrochent beaucoup plus facilement que sur les liaisons rigides de la sérine.

6° A 56°, température de destruction de l'alexine, l'équilibre protéïnique $\frac{\text{Sérine}}{\text{Globuline}}$ est nettement rompu en faveur de la « *globuline* », *malgré la stabilité des lipides* qui leur sont associés. Cette observation tend à nous démontrer une fois de plus le rôle important de la « *globuline* » dans le pouvoir complémentaire du sérum.

DEUXIEME PARTIE

« *INDEX-TYROSINE* » DES POLYPEPTIDES SERIQUES

I. — Determination colorimetrique de l'*Index-Tyrosine* des polypeptides

Au problème des protéides qui occupe la première partie de ce travail doit se rattacher logiquement l'étude des produits de désintégration de ces mêmes matières protéïques.

On sait que le métabolisme de telles substances organiques est extrêmement complexe. Le clivage de cette molécule protidique a été approfondi néanmoins facilement dans ses derniers stades, dont l'un, le « *stade polypeptide* » n'a cessé d'attirer l'attention d'un grand nombre de cliniciens. Depuis les travaux de Cristol-Puech [26] [28], Fiessinger-Herbain [37], le problème de l'intoxication azotée suit de très près celui de la polypetidémie. Nous ne saurions envisager ici la valeur pathologique de l' « *indice de polypeptidémie* » et de l' « *indice de désamination* » très bien mise en relief par ces auteurs.

Depuis lors, on conçoit l'importance et l'intérêt clinique que présente la détermination du taux de ces polypeptides. Cependant, les procédés analytiques dont nous disposons à

l'heure actuelle n'arrivent pas encore à isoler dans sa totalité cette masse polypeptidique pour en définir ensuite la nature physico-chimique, comme on l'a fait pour les divers fractionnements protéïdiques (Sérine-Globuline) du sérum. L'ingéniosité des savants envisage alors le problème sous un autre aspect. On cherche à identifier le rôle néfaste de ces polypeptides dans l'économie de l'organisme d'après la richesse de leurs constituants, beaucoup plus facilement saisissables. De là est née la conception de deux méthodes analytiques assez voisines. D'un côté, on dose les polypeptides d'après leur teneur en azote; de l'autre côté, le même dosage se fait d'après la quantité de noyaux tyrosiniques que renferment ces polypeptides.

Le principe même de ce dosage a été établi par Cristol [26] en se basant sur la différence du pouvoir déféquant de l'acide trichloracétique et de l'acide phosphotungstique à des concentrations déterminées. Alors que l'acide trichloracétique ne précipite que les protéïdes complexes du sérum, l'acide phosphotungstique dont la force déféquante est plus considérable, entraîne non seulement les protéïdes complexes, mais encore les polypeptides, en ne laissant passer dans le filtrat que l'urée, l'acide urique, les acides aminés libres (tyrosine-tryptophane), les corps sulfurés, les phénols [67].

Le procédé au « *double-azote* » de Cristol consiste dans la détermination de l'*azote-polypeptidique* appelé encore « *indice de polypeptidémie* » d'après la différence entre les quantités respectives d'azote fournies par le filtrat trichloracétique (azote total non-protéïque) et le filtrat phosphotungstique. Et l' « *indice de désamination* » de Fiessinger [37] est le rapport entre l'azote polypeptidique et l'azote total non-protéïque. [L'Azote est dosé après Kjeldahlisation dans un appareil de Parnas-Wagner].

Cette méthode présente une portée scientifique rigoureuse. Cependant, elle n'est pas bien commode dans les pratiques courantes des laboratoires d'analyses et nécessite un prélèvement de sang assez important.

D'autres auteurs envisagent alors un procédé de dosage *Colorimétrique* de ces mêmes polypeptides d'après leur teneur en tyrosine. On a remarqué, en effet, que dans l'agrégat d'acides aminés qui constituent les polypeptides, le noyau de la tyrosine est facilement décelable par certains réactifs appropriés.

Une bibliographie fort importante et une étude très approfondie furent consacrées aux réactions colorées de la tyrosine et du tryptophane (Guerin [51]) dans le dosage des matières protéïques.

Ces dernières années, quelques auteurs ont essayé d'appliquer ces réactions colorées au dosage des polypeptides sériques.

Ainsi, l'*hydrate de triceto-hydrindène* ou *ninhydrine* donne avec les acides α-aminés une coloration bleue qui permet de doser après hydrolise, tous les polypeptides [Polonowski [89]. La réaction serait proportionnelle au nombre de groupements amino-acides libérés et en dosant, d'autre part, l'azote polypeptidique total, on pourra déterminer le nombre de liaisons peptidiques que renferment les polypeptides examinés.

Lefaux [67] et Goiffon-Spaey [47] de leur côté, utilisent la réaction *xanthoprotéïque* et la réaction*phénolique* de Folin-Denis. Ces deux méthodes nouvellement préconisées nous paraissent plus intéressantes.

A. — Methode de Lefaux. — La réaction *xanthoprotéïque* ainsi appelée à cause de la coloration jaune-citron qu'elle donne par action de l'acide azotique à l'ébullition sur les matières protéïques est connue depuis longtemps. Elle est en particulier très caractéristique mais non spécifique des fonctions phénoliques par formation de phénols nitrés jaunes. Cette réaction pratiquée sur les deux filtrats trichloracétiques et phosphotungstiques donne une coloration d'intensité inégale qui serait due à la Tyrosine, un peu à la phénylalanine et au tryptophane contenus dans les polypeptides.

L' « *index-Tyrosine* » des polypeptides sériques se mesure ensuite colorimétriquement à l'aide d'une solution étalon de tyrosine.

D'autre part, on peut déterminer dans le filtrat phosphotungstique, l' « *indice des phénols* » calculé en tyrosine. En effet, la coloration fournie par ce filtrat est en proportion avec le nombre de fonctions phénol libres parce qu'au cours de la défécation phosphotungstique une grande partie de la tyrosine et du tryptophane libre ont été éliminés. Cet indice serait caractéristique de certains états pathologiques.

On sait que tous les corps à fonction phénol donnent une coloration bleue sous l'action du réactif phosphotungstomolybdique de Folin- Denis, dit d'ailleurs « *réactif des phénols* ». Cette coloration assez stable est proportionnelle en intensité à la quantité de tyrosine correspondante. En réali-

B. — Methode de Goiffon-Spaey.

té, ce réactif n'est pas propre à la tyrosine; il s'étend encore aux tryptophanes libres, à l'acide urique, et à certains produits sulfurés du sérum [47].

Les filtrats de désalbumination trichloracétique et phosphotungstique traités par ce réactif donnent une coloration bleue d'intensité inégale. La mesure colorimétrique, à l'aide d'une solution étalon de tyrosine, de cette différence, donne l' « *index-tyrosine* » des polypeptides du sérum (1).

*
**

Ainsi établies, ces deux méthodes colorimétriques de Lefaux et Goiffon représentent une valeur quelque peu conventionnelle [77]; il se pourrait bien qu'il y ait des polypeptides sans noyaux de tyrosine. D'ailleurs, les partisans de la méthode au « *double-azote* » leur adressent encore quelques critiques.

D'une part on reproche leur mauvaise technique de désalbumination et d'autre part, le manque de spécificité du réactif phospho-molybdo-tungstique [en dehors du groupe des acides aminés renfermant le noyau de la tyrosine, ce réactif agit également sur les amino-acides-alcools, sérine et oxyproline, notamment]. P. Cristol-Monnier [27].

Nous nous garderons bien d'entrer dans cette discussion scientifique qui revient de droit aux auteurs de ces méthodes. Pourtant, nous ne saurions passer sous silence les obser-

---

(1) Les solutions déféquantes trichloracétique et phosphotungstique d'après ces deux méthodes colorimétriques n'ont pas exactement la même concentration que celles de Cristol.

vations mêmes de Goiffon, dans l'étude comparative de sa méthode et de celle de Cristol [47]. « *Les polypeptides mesurés n'ont pas toujours le même taux de tyrosine pour une même quantité d'azote. Sont-ce les polypeptides plus riches en tyrosine, sont ceux plus riches en azote dont la présence en excès dans le sérum a le plus d'importance en pathologie* » ?

*
**

Telles qu'elles se présentent, ces deux méthodes colorimétriques nous semblent présenter toutefois un intérêt pratique réel. Nos recherches personnelles consistent dans l'examen de cette question sous un autre angle :

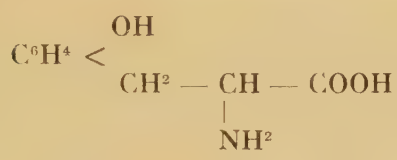
1° Il s'agit de savoir si tous les noyaux hydroxylés-tyrosiniques, quelles que soient les substitutions qui s'y rattachent, donnent la même coloration avec le réactif phosphomolybdo-tungstique de Folin.

2° Au cours de nos examens colorimétriques, d'après ces méthodes, le classique colorimètre Duboscq-Pellin ne nous donne pas des résultats tout à fait satisfaisants à cause de la coloration relativement faible des deux filtrats trichloracétique et phosphotungstique. Comment remédier à ce léger inconvénient? - Nous verrons par la suite que le recours à la spectro-colorimétrie est très avantageux.

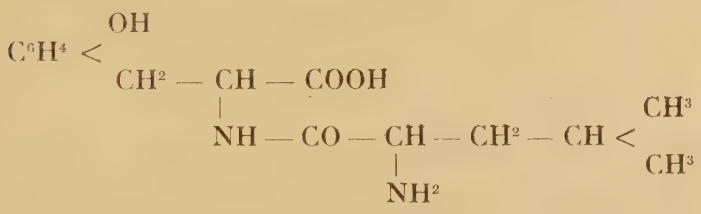
1° *Comportement de quelques noyaux hydroxylés-tyrosiniques en présence du « réactif des phénols » de* Folin.

Nous avons utilisé pour nos expériences :

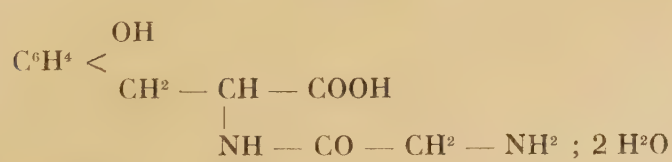
1° la *l - Tyrosine « Roche »*



2° la *l - leucyl - l - Tyrosine*



3° la *Glycyl - l - Tyrosine*



4° la *Tyramine* (chlorhydrate)

5° la *Dibromo-Tyrosine* ou Acide α - amino β (3,5 dibromo - 4 oxyphényl-propionique) :

$$C^6H^2Br^2 < \begin{matrix} OH \\ CH^2 - CH - COOH; \ 2\ H^2O \\ \quad\quad | \\ \quad\quad NH^2 \end{matrix}$$

6° la *Diiodo-Tyrosine* ou Acide α - amino - β (3,5 diiodo-4 - oxyphényl - propionique) :

$$CH^6H^2I^2 < \begin{matrix} OH \\ CH^2 - CH - COOH; \ 2\ H^2O \\ \quad\quad | \\ \quad\quad NH^2 \end{matrix}$$

7° une *Tyrosine de provenance allemande.*

Tous ces produits ont été passés au vide sulfurique pendant 24 heures pour enlever les quelques traces d'eau qu'ils pourraient renfermer. Cette précaution est indispensable.

Nous faisons d'abord une solution titrée de tyrosine à 20 mgr. par litre. Les autres produits cités plus haut ont été mis également en solution (à l'aide de 100 cc. d'HCl. n/10) à une teneur telle que tous renferment par litre la même concentration en OH phénolique que la solution étalon qui vient d'être préparée. Il suffit pour cela de multiplier le poids moléculaire de ces produits par $\frac{20 \text{ mgr.}}{181}$ (181 étant le poids moléculaire de la Tyrosine).

La réaction colorée a été obtenue dans les mêmes conditions opératoires établies par Goiffon pour le dosage de l' « *Index-Tyrosine* » des polypeptides. L'examen au spec-

tro-colorimètre de Duboscq-Pellin, nous a révélé que : (1)

1° la *l - Leucyl - l - tyrosine* ; la *Glycyl - l - tyrosine*, et le *Chlorhydrate de tyramine* donnent une coloration identique par rapport à la solution-témoin de tyrosine.

2° la *dibromo* et *la diiodo-tyrosine* donnent une coloration beaucoup plus faible.

Ces faits expérimentaux prouvent que :

a) Le réactif phosphomolybdotungstique est caractéristique du noyau de la tyrosine. L'accolement de certaines chaînes hydrocarbonées n'exerce aucune influence perturbatrice sur la réaction colorée elle-même.

b) Par contre, la présence dans ce noyau, des substitutions métalloïdiques à poids moléculaire élevé, trouble l'effet du réactif de Folin.

⁂

2° *Emploi du spectro-colorimètre de* Duboscq-Pellin *pour la mesure de l' « index-Tyrosine » des polypeptides.*

Dans le cas qui nous intéresse, le classique colorimètre de Duboscq-Pellin ne nous a donné qu'une satisfaction toute relative à la suite de difficultés d'ordre pratique auxquelles nous nous sommes heurté. Malgré le réglage facile de l'in-

(1) La Tyrosine de provenance allemande et la Tyrosine « Roche » sont identiques. Elles donnent une intensité égale de coloration.

tensité lumineuse incidente que permet le miroir mobile de ce colorimètre, la lumière du jour dont nous nous sommes servi fournit un éclairage assez hétérogène et encore trop fort par rapport à la faible coloration de nos solutions à doser. Ce qui a pour effet de provoquer parfois des écarts considérables entre deux lectures consécutives. De plus, le titre de la solution étalon nous paraît faible. Cependant, nous avons respecté les données de Goiffon car l'augmentation de ce titre créera encore une différence plus grande entre la coloration de cette solution-témoin et celle des solutions que nous avons à doser.

En nous inspirant des travaux de Canals et Cabanes [17] [18] ces causes d'erreurs ont pu être écartées. D'une part, l'éclairage naturel du jour a été remplacé par un éclairage électrique réglable à volonté, et d'autre part, d'après les avis de ces auteurs, nous avons pensé que le recours à la spectrocolorimétrie est tout indiqué pour les solutions que nous avons à examiner parce qu'elles présentent des bandes d'absorption assez nettes dans le vert.

Le principe de la spectrocolorimétrie est le même que celui de la colorimétrie. Seulement au lieu de faire la comparaison eu lumière blanche, on opère pour une région déterminée du spectre. Avant la mesure, on choisira donc les régions spectrales appropriées aux solutions qu'il s'agit d'étudier.

Le spectrocolorimètre de Pellin qui a servi à nos expériences n'est autre qu'un colorimètre Duboscq ordinaire dans lequel l'oculaire a été remplacé par un spectroscope à vision directe. Ce spectroscope est placé de telle sorte que sa fente soit à cheval sur la ligne qui sépare les deux demi-cercles lumineux que l'on voit dans l'oculaire. On a ainsi deux spectres superposés correspondant aux deux godets de l'appareil. La lumière en traversant ces godets préalable-

ment garnis de solutions colorées fournira donc deux spectres d'absorption, l'un relatif à la solution étudiée, l'autre à l'étalon. On peut facilement régler l'intensité de ces deux spectres en faisant augmenter ou diminuer la hauteur du liquide coloré traversé par la lumière incidente. Pour permettre la comparaison des spectres dans une longueur d'onde déterminée, l'appareil porte un système de deux volets mobiles pouvant se déplacer dans le plan du spectre. La région du spectre que l'on désire isoler sera ainsi facilement délimitée grâce à ces volets. D'autre part, une échelle millimétrique et un vernier assure le repérage rapide du déplacement des volets. Cette échelle, permet, par un étalonnage préalable, d'amener la plage dans une longueur d'onde déterminée.

Ce spectrocolorimètre est accompagné d'un appareil d'éclairage fort commodément monté sur une planchette. Il comprend: 1° Une cage cylindrique munie à sa partie antérieure d'un condensateur au foyer duquel la source lumineuse est représenté par une lampe de 110 volts à filaments ramassés; — 2° L'éclairage est réglé à volonté grâce à un rhéostat intercalé sur le courant même de la lampe ; 3° Pour opérer en lumière diffuse, un verre dépoli sera placé immédiatement au-devant du condensateur [8].

En respectant toutes les conditions et précautions opératoires signalées par Cabanes [17] : mise au point de l'appareil — utilisation d'un éclairage de faible intensité en chambre noire pour des colorations peu intenses — ; la différence de coloration entre la solution-étalon et les solutions à mesurer ne doivent pas dépasser le rapport de 1,5 — les épaisseurs moyennes des couches absorbantes doivent être aux environs de 15 mm.; — la mesure n'est acceptable que d'après la moyenne de trois lectures avec un intervalle de repos de quelques minutes entre chaque lecture pour éviter

la fatigue des yeux; - cette méthode spectrocolorimétrique pour la mesure de l' « *index-tyrosine* » nous a donné des résultats très satisfaisants. L'erreur relative commise varie entre 3 et 5 % au maximum.

*
**

II. — Valeur de l' « *Index-Tyrosine* » des polypeptides chez quelques espèces animales suivant la méthode de Goiffon

Variations de cet « *Index* » au cours du vieillissement et du chauffage

A. — *Mode opératoire.* — Réactifs:

1° Réactif dit des « *phénols* » de Folin et Denis (formule de Wu [47]

Tungstate de soude	100 gr.
Molybdate de soude	25 gr.
Eau	700 cc.

Après dissolution, ajouter:

Acide phosphorique à 85 %	50 cc.

[Employer de préférence l'acide phosphorique cristallisé. *chimiquement pur* (Fontès et Thivolle) [42]

Acide chlorhydrique concentré . .	100 cc.

Faire bouillir au réfrigérant ascendant pendant 8 heures.

La solution jaune est diluée avec de l'eau jusqu'à 1 litre.

2° Solution d'acide trichloracétique à 30 gr. par litre.

3° Solution d'acide phosphotungstique à 22 gr. par litre.
Acide phosphotungstique: 22 gr.
Acide chlorhydrique normal: 30 cc.
Eau q. s. p: 1000 cc.

4° Solution de carbonate de soude cristallisé à 10 %.

5° Solution de Tyrosine à 10 mgr. par litre.
[10 mgr. de Tyrosine dissous dans 1.000 cc. d'HCl n/10]

6° Solution aqueuse de sulfite de sodium saturée.

Technique. — 1° Dans deux tubes à centrifugation, faire parallèlement deux défécations, à savoir : 1 cc. de sérum sera dilué dans 9 cc. d'acide trichloracétique et 1 autre cc. sera dilué dans 9 cc. d'acide phosphotungstique.

Agiter fortement avec une baguette et centrifuger au bout de 15 minutes.

2° Prélever 5 cc. de chacun des filtrats, dans une petite éprouvette graduée. Ajouter 2 gouttes de « *réactif des phénols* », puis 4 cc. de solution de carbonate de soude. Une coloration bleue se développe dont on révèle l'intensité maxima en ajoutant au bout de 30 minutes, une goutte ou deux de la solution de sulfite de soude. Ajuster à 10 cc. avec de l'eau distillée.

3° Comparer au spectrocolorimètre de Pellin. On constatera une bande d'absorption très nette dans la région du

TABLEAU V

Index-Tyrosine chez l'Homme et quelques espèces animales

Résultats exprimés en milligrammes de Tyrosine par litre de sérum	HOMME	CHEVAL	BŒUF	VACHE	MOUTON	PORC	CHAT
Tyrosine - Trichloracétique	67	80	52	47	61	45	125
Tyrosine-Phosphotungstique	41	60	29	30	28	25	100
Index-Tyrosine polypeptidique	26 mgr.	20 mgr.	23 mgr.	17 mgr.	33 mgr.	20 mgr.	25 mgr.

TABLEAU VII

Sérum de Cheval. — Variations de l'Index-Tyrosine avec la Température et le Temps

Résultats exprimés en milligrammes de Tyrosine par litre	T° du Labo. 16-17° 5 heures après le prélèvement	Sérum chauffé à 37° pendant 2 h. 10'	Sérum maintenu à 56° pendant 2 h. 10'	T° du Labo 16-17° 7 jours après le prélèvem.	T° de la Glacière 2-3° 7 jours après le prélèvem.
Tyrosine-Trichloracétique	48 mgr.	50	44	83	59
Tyrosine-Phosphotungstique	36 mgr.	34	37	72	37
Indice-Tyrosine polypeptidique	12 mgr.	16 mgr.	7 mgr.	11 mgr.	22 mgr.

vert] avec 5 cc. de la solution de tyrosine traités comme ci-dessus par le réactif des phénols.

Soit H et H' les épaisseurs sous lesquelles le liquide étalon et les liquides inconnus ont la même intensité colorée. On a dans les conditions opératoires présentes : $\frac{H}{H'} \times 100 =$ *nombre de milligrammes de tyrosine par litre de sérum.*

Il ne reste plus qu'à faire la différence entre les valeurs obtenues pour le filtrat trichloracétique et le filtrat phosphotungstique pour avoir l'*indice-tyrosine des polypeptides.*

Nous avons expérimenté cette méthode sur du *sang humain* ainsi que sur du sérum de quelques espèces animales: le *Cheval,* le *Bœuf,* la *Vache,* le *Mouton,* le *Porc,* le *Chat* [Cf. Tableau V, page 82].

Remarques. — La solution-étalon de tyrosine s'altère assez vite. De plus, le dosage doit se faire dans la demi-heure qui suit l'obtention de la réaction colorée.

Dans une communication toute récente, Liegeois [65 bis] a publié des chiffres obtenus avec le colorimètre *Hellige.* Certains de nos résultats concordent parfaitement avec les siens [Cf. Tableau V (Porc) — et VII (Cheval) p. 82].

B. — Nous avons étudié ensuite l'influence du *vieillissement* et du *chauffage* sur la valeur de cet indice-tyrosine. Le sérum a été conservé à la température de la glacière et à celle du laboratoire. Une autre partie a été portée à 37° et à 56° pendant deux heures. Nos résultats sont reproduits dans les tableaux VI et VII (Cf. pages 82 et 84).

Résultats donnés en milligrammes de Tyrosine par litre de sérum	Sérum de Cheval. Conservation à la Glacière : T° 2°-3°. Indice-Tyrosine.								
	Sérum frais. 5 heures		9 h.	24 h.	48 h.	72 h.	96 h.	120 h. — [5 jours]	168 h. — [7 jours]
Nombre d'heures après le Prélèvement	N° 1	N° 2							
Tyrosine-Trichloracétique	48	»	»	»	»	»	»	»	59
	»	60	»	100	75	»	72	67	»
Tyrosine - Phosphotungstique	36		»	»	»	»	»	»	37
	»	25	»	57	50	»	42	40	»
Indice - Tyrosine polypeptidique	12 mgr.	»	»	»	»	»	»	»	22 mgr.
		35 mgr.	»	43 mgr.	25 mgr.	»	30 mgr.	27 mgr.	»

Indice-Tyrosine. — Sérum de Cheval. — Conservation à la T° du Laboratoire. — 16°-18°

Nombre d'heures après le prélèvement	Sérum frais. 5 heures				9 h.	24 h.	48 h.	72 h.	96 h.	120 h.	168 h. [7 jours]
	N° 1	N° 2	N° 3	N° 4							
Tyrosine-Trichloracétique	80	48	60	»	50	97	70	»	66	66	48
			»	59	»	»	»	66	»	»	72
Tyrosine - Phosphotungstique	60	36	25	»	20	60	40	»	39	39	28
			»	37	»	»	»	40	»	»	62
Indice - Tyrosine polypeptidique	20 mgr.	12 mgr.	35 mgr.	»	30 mgr	37 mgr.	30 mgr.	»	27 mgr.	27 mgr.	22 mgr.
			»	22 mgr.	»	»	»	26 mgr.	»	»	10 mgr.

Après deux heures de séjour à 37° et à 56° se manifeste déjà une destruction certaine d'une petite quantité de protéïdes totaux. Mais le mécanisme de la polypeptidolyse correspondante se présente sous un aspect trop irrégulier. [Cf. également tableau IV, pages 62-63].

Quant à l'influence du Vieillissement sur la valeur de l' « *index-tyrosine* » des polypeptides, nos résultats et nos conclusions rejoignent ceux de Zein [111] dont l'étude a porté sur les variations de l'azote polypeptidique et de l'azote total non-protéïque.

Au cours de la conservation, nous avons également constaté que la diminution des protéïdes totaux correspond bien à une augmentation *irrégulière* mais *constante* de la tyrosine appartenant aux matières non-protéïques. Les taux de la tyrosine-polypeptidique correspondante subissent des fluctuations en plus ou en moins tout aussi capricieuses. Tout ceci semble confirmer le mécanisme de la *protidolyse normale* signalée par Julien [60].

TROISIEME PARTIE

1° Sur une AMELIORATION du Microdosage iodométrique de l'Urée sanguine par oxydation sulfochromique de la Dixanthylurée.

2° Variations du taux reel de l'Urée sanguine au cours de la conservation.

Tout le monde s'accorde à reconnaître la valeur scientifique rigoureuse de la réaction de Fosse [43] et les méthodes de microdosage de l'urée sanguine préconisées ces dernières années l'ont définitivement mise en honneur.

Nous passerons sous silence certains procédés qui ne sont pas entrés dans le domaine pratique à cause de leurs difficultés de réalisation, entr'autres le procédé à la *zéolithe synthétique* ou *permutite* et le procédé biochimique à *l'uréase* de Mme Pohorecka et Lelesz [88]. J. A. Sanchez [103] a signalé même tout récemment un dosage colorimétrique par le réactif sulfanilique-phénolique en présence d'un excès d'acide nitreux.

On sait que le *xanthydrol* (diphéno-pyranol) précipite quantitativement l'urée en milieu acétique à l'état de dixanthylurée:

$$CO<\begin{matrix}NH^2\\NH^2\end{matrix} + 2\left|CHOH<\begin{matrix}C^6H^4\\C^6H^4\end{matrix}>O\right| =$$

$$2\,H^2O + O<\begin{matrix}C^6H^4\\C^6H^4\end{matrix}>CH-NH-CO-NH-CH<\begin{matrix}C^6H^4\\C^6H^4\end{matrix}>O$$

dont le poids moléculaire [420] est exactement sept fois celui [60] de la carbamide elle-même. (Nicloux et Welter)

Cette réaction est spécifique de l'urée (Hugounenq et Morel [58] et permet d'en faire un dosage pondéral très précis (Fosse-Robyn et François) [44]. Toutefois dans l'échelle de la micro-analyse, la difficulté que présente l'application pratique de cette méthode s'oppose à la simplicité de la réaction elle-même. La récolte d'une si faible quantité de précipité ne se fait pas sans une légère perte et l'emploi d'une microbalance très sensible n'est pas à la portée de tous les laboratoires d'analyses courantes biochimiques.

Aussi, tout en retenant la supériorité du procédé au xanthydrol, a-t-on envisagé différentes méthodes volumétriques à partir de cette dixanthylurée.

Boivin [12] avait ainsi préconisé deux méthodes. La première utilise la kjeldahlisation de la dixanthylurée. L'ammoniac formé est déplacé dans un appareil de Parnas-Wagner et titré ensuite acidimétriquement. Le second procédé consiste dans un dosage du carbone par la microméthode de Nicloux, après une attaque sulfo-chromique de la dixanthylurée, en l'absence cependant de chromate d'argent. Ces techniques bien qu'intéressantes du point de vue théorique sont fort peu commodes dans la pratique.

Cordebard [22] garda encore le principe de l'oxydation sulfo-chromique de la dixanthylurée et préconisa vers la même époque, le titrage de l'excès de ce réactif oxydant à l'aide d'une solution de sulfate ferreux, le ferricyanure de potassium étant utilisé comme indicateur externe. Cependant cette méthode ne répond pas aux exigences de la microanalyse.

A l'heure actuelle, en se limitant dans le cadre du microdosage par emploi d'une petite quantité de sérum sanguin, il n'existe plus que deux techniques qui semblent présenter une portée pratique vraiment intéressante. La dixanthylurée sera oxydée soit par un mélange sulfo-iodique selon Cuny et Robert [25] soit par un mélange sulfo-chromique selon Allen et Luck [4], et l'excès de réactif oxydant sera titré par iodométrie. De la quantité de réactif oxydant consommé on pourra déduire la quantité de dixanthylurée et corrélativement d'urée.

En particulier, la méthode d'Allen et Luck mise au point par Cuny et Robert est devenue maintenant classique et d'un emploi courant (Fleury [39])

Au cours de nos essais sur cette méthode, une difficulté d'ordre pratique nous a arrêté. Le précipité de dixanthylurée se prête très mal à la centrifugation, même pendant longtemps et à une grande vitesse. Une partie de ce précipité a toujours tendance à grimper le long du tube; la séparation à l'aide d'une micropissette d'Ambard risque toujours d'en enlever une faible quantité et de laisser par la suite un volume assez appréciable de l'alcool de lavage saturé de

xanthylurée; ce qui aurait pour effet de fausser légèrement le dosage.

Nous avons constaté que l'addition, avant la centrifugation, de trois gouttes d'une émulsion de *sulfate de baryum* à 2 % retient très énergiquement le précipité. Le temps de centrifugation se réduit alors beaucoup et la liqueur surnageante peut être décantée par retournement complet du tube sans qu'une quantité perceptible de précipité soit entraînée. Les dernières gouttes de liquide qui restent sur les bords et le long du tube à centrifugation seront enlevées par une série de petits tortillons de papier filtre qui remplacent ainsi avantageusement et commodément la micropissette d'Ambard préconisée par Fleury [39]. Cette centrifugation laborieuse a d'ailleurs été remarquée par Cuny et Robert [25]. Tout en observant qu'un double lavage du précipité de dixanthylurée donne un résultat plus juste, ces auteurs ont néanmoins recommandé un unique lavage avec une quantité d'alcool plus considérable précisément pour éviter les pertes occasionnées par les décantations successives. L'amélioration que nous avons apportée dans la centrifugation nous a permis de faire un double lavage avec une quantité moindre d'alcool sans aucun risque de perte du précipité.

Ces auteurs ont recommandé par ailleurs de laver la dixanthylurée formée avec de l'alcool saturé de xanthylurée. Et c'est ainsi que nous avons tenu à vérifier et à déterminer la limite de solubilité de la dixatnhylurée dans l'alcool éthylique à 95°. Pour cela, la dixanthylurée préparée à partir d'une solution aqueuse d'urée et l'alcool sont mis en contact pendant 24 heures. S'il s'en dissout quelque peu dans l'alcool, l'Azote de la dixanthylurée doit se retrouver dans le microdosage au Parnas-Wagner, après kjeldahlisation d'une quantité connue d'alcool [Bien entendu, on doit faire

un dosage témoin pour s'assurer que l'alcool employé est exempt d'azote]. — Nous avons retrouvé avec ce procédé que 100 cc. d'alcool éthylique à 95° dissolvent environ 5 à 7 milligrammes de dixanthylurée, à la température du laboratoire. Tandis que Cordebard avait indiqué que la même quantité d'alcool dissolvent à cette température 3 milligrammes de xanthylurée. L'alcool méthylique se comporte à peu près de la même manière. Quoi qu'il en soit, ce résultat démontre que l'alcool saturé de xanthylurée est indispensable pour le lavage du précipité de dixanthylurée.

Ces considérations étant notées, voici la technique opératoire que nous avons adoptée [39].

Réactifs :

1. *Réactif* de Tanret-Fosse modifié par Polonowski

Acétate de Ca	1 gr.
ou Carbonate de Ca	0 gr. 85
Chlorure Hg + + ...	2 gr. 71
Iodure de K	7 gr. 20
Acide acétique	67 cc.
Eau distillée q. s. p.	100 cc.

L'addition d'un sel de calcium est destiné à éliminer le fluorure de sodium dans le cas où l'on utiliserait un sang fluoré, ce dernier amenant une surchage dans les résultats (Polonovski et Auguste) [90].

2. Acide acétique pur exempt d'acides minéraux.

3. Solution de xanthydrol à 5 % dans l'alcool méthylique pur (99-100°)

4. Acide sulfurique pur (93 à 95 % de SO^4H^2) D = 1,83

5. Alcool éthylique à 95° saturé de xanthylurée.

6. Solution environ N/3 de bichromate de potassium [solution à 16 gr. (pesé au trébuchet) par litre.]

7. Solution titrée d'hyposulfite de sodium vingtième normale.

8. Solution d'iodure de potassium à 20 gr. %.

9. Empois d'amidon à 0,2 %.

10. Emulsion de SO^4Ba à 2 %.

*
**

Le microdosage en lui-même comporte trois temps:

Premier temps. -- Défécation. — Dans un tube à centrifugation d'environ 15 cc., mesurer 1 cc. de plasma ou de sérum sanguin, 1 cc. de réactif de Tanret et 3 cc. d'eau distillée. Bien agiter avec une petite baguette en verre et centrifuger.

Deuxième temps. — Obtention de la Dixanthylurée.

a — A 1 cc. du liquide provenant de la défecation, ce qui correspond donc à 0 cc. 2 de sérum initial, ajouter dans un autre tube à centrifugation, 1 cc. d'acide acétique et 0 cc. 2 de la solution méthylique de xanthydrol à 5 %. Mélanger et agiter avec une petite baguette. Au bout de cinq minutes le précipité de dixanthylurée commence à se former. Laisser reposer environ trente minutes tout en agitant de temps en temps.

Puis ajouter III à IV gouttes de l'émulsion de SO^4Ba à 2 %. Agiter, laver l'agitateur et les parois du tube avec quelques gouttes d'alcool éthylique saturé de xanthylurée.

b — Centrifuger pendant cinq minutes. Le précipité de dixanthylurée s'agglomère très bien au fond du tube.

Décanter la liqueur surnageante en retournant complètement le tube et enlever les dernières gouttes avec des tortillons de papier filtre. Laver par centrifugation deux fois avec 3 cm³ d'alcool saturé de xanthylurée chaque fois.

c — Porter à l'étuve à 100-110° le précipité de dixanthylurée pendant 15 à 20 minutes pour chasser les dernières traces d'alcool.

Troisième temps. — Oxydation de l'uréïne.

a — Ajouter dans le tube à centrifugation après refroidissement, 3 cc. *exactement* mesurés de bichromate de potasse $\frac{N}{3}$. Remuer avec l'agitateur. Ajouter 5 cc. d'acide sulfurique pur et mélanger aussitôt à l'aide de l'agitateur jusqu'à dissolution totale de la dixanthylurée. Laisser l'oxydation se poursuivre pendant cinq minutes.

b — Transvaser ce produit de l'oxydation dans un grand bécher de 500 cc. [L'emploi d'une fiole conique d'après Fleury n'est pas à recommander]. Laver l'agitateur et rincer cinq fois le tube avec de l'eau distillée. Ajouter environ 50 cc. d'eau et 2 cc. d'iodure de potassium à 20 %. Laisser en contact pendant 3 minutes. Puis, ajouter encore 300 cc. environ d'eau distillée. Il s'agit en effet, d'atténuer le plus possible la coloration gênante du sel de chrome.

Titrer ensuite l'iode libéré avec n' cc. de la solution d'hyposulfite $\frac{n}{20}$. Ajouter l'empois d'amidon vers la fin du dosage, lorsqu'on atteint la coloration vert pâle. Le virage final est marqué alors par la disparition de la coloration bleue.

Remarques. — On ne doit diluer fortement, comme il est indiqué ci-dessus, qu'après addition d'iodure de potassium et libération complète d'iode. Sinon le virage final pourrait être faussé par une réapparition de la teinte bleue.

Hahn [53] a signalé par ailleurs les réactions secondaires qui se produisent au cours de la détermination iodométrique des chromates. Il se forme dans ces conditions un complexe par réaction du chrome chromique et du thiosulfate, complexe sur lequel l'iode n'agit que très lentement. L'addition d'iode devrait donc se faire lentement et l'emploi d'un excès d'hyposulfite serait écarté si on attend un moment avant de commencer le titrage.

c Faire parallèlement un témoin, *exactement* dans les mêmes conditions, mais sans dixanthylurée. Et titrer l'iode libéré avec l'hyposulfite $\frac{n}{20}$; soit n cm^3 le volume d'hyposulfite versé.

Calcul. — Le mécanisme de l'oxydation sulfo-chromique a été fort bien étudié par Cordebard [22]. On sait d'abord que la réduction d'une molécule-gramme de bichromate correspond à la mise en liberté de 3 atomes d'oxygène suivant la réaction classique:

$$Cr^2\,O^7\,K^2 + 4\,SO^4\,H^2 = (SO^4)^3\,Cr^2 + SO^4\,K^2 + 4\,H^2\,O + 3\,O$$

A la température d'ébullition, l'urée en présence du mélange sulfo-chromique à parties égales se comporte d'une façon toute particulière. Il n'y aurait pas réduction totale de l'oxamide comme on pouvait le supposer. Il se produit simplement une hydrolyse avec mise en liberté d'ammoniaque et de gaz carbonique. L'eau apportée par les réactifs ou formée au cours de la réaction fournissent l'hydrogène ou l'oxygène nécessaire à l'hydrogénation de l'azote ou à l'oxydation du carbone.

$$CO\begin{<}{NH^2}{NH^2} + H^2O = 2\,NH^3 + CO^2$$

D'autre part, sous l'angle de l'oxydation sulfo-chromique, la dixanthylurée obtenue suivant la réaction de Fosse doit être considérée seulement comme un complexe formé par la « *juxtaposition* » de 2 molécules de xanthydrol et d'une molécule d'urée, avec perte de 2 molécules d'eau. De sorte que finalement, seules les 2 molécules de xanthydrol, après avoir perdu 2 molécules d'eau, sont brûlées sous forme de CO^2 et H^2O.

Cette réaction pourrait se représenter schématiquement sous la forme:

$$[CO\,(NH^2)^2 - C^{26}\,H^{16}\,O^2] + 58\,O =$$
$$= 26\,CO^2 + 8H^2\,O + CO\,(NH^2)^2$$

Et l'équation globale de l'oxydation s'écrira alors:

$$3\,[CO\,(NH^2)^2 - C^{26}\,H^{16}\,O^2] + 58\,Cr^2\,O^7\,K^2 + 232\,SO^4\,H^2 =$$
$$= 58\,(SO^4)^3\,Cr^2 + 58\,SO^4\,K^2 + 256\,H^2\,O +$$
$$+ 78\,CO^2 + 3\,CO\,(NH^2)^2$$

Cette remarque a son importance car, théoriquement, on pouvait supposer que la dixanthylurée a été totalement brûlée en eau, acide carbonique et azote; ce qui nécessiterait l'intervention de 61 atomes d'oxygène.

De sorte que 1 cm^3 de $S^2 O^3 Na^2$ $\frac{n}{20}$ correspond à 0 mgr. 02586 d'urée.

Finalement, dans nos conditions opératoires présentes, le taux d'urée sera donné par la formule suivante:

$$\text{Urée (en mgr. par litre)} : \frac{[n - n'] \times 0{,}02586 \times 1.000}{0{,}2} = [n - n'] \times 129{,}3$$

Remarques. — Pour des taux d'urée sanguine supérieurs à 1 gramme par litre — on peut s'en rendre compte à vue d'œil d'après l'importance du précipité — répéter la précipitation sur un volume moindre de filtrat ou bien utiliser une solution oxydante plus forte $\frac{N}{1,5}$ = 32 gr. de bichromate par litre. Faire le calcul en conséquence.

Cette technique ainsi améliorée donne des résultats très satisfaisants. Nous l'avons vérifiée avec des solutions titrées d'urée à 0 gr. 250 et 0 gr. 400 par litre. L'erreur relative commise n'a pas dépassé 3 %.

Evidemment, en dehors de son intérêt théorique, ce microdosage dont l'exécution longue et laborieuse réclame des soins minutieux [récolte de la dixanthylurée — oxydation — altération rapide de la solution titrée d'hyposulfite] ne sera pas employé journellement dans les laboratoires d'analyses. Toutefois, il pourra être pratiquement utile dans les cas où l'on dispose d'une très faible quantité de sang.

TABLEAU VIII

Variations du taux d'Urée sanguine pendant la conservation

Nombre d'heures après le prélèvement	Urée [Hypobromite]			Urée [Xanthydrol]		
	T° du Laboratoire 16-17°		T° de la Glacière 2-3°	T° du Laboratoire 16-17°		T° de la Glacière 2-3°
Résultats en grammes par litre	Cheval	Mulet	Mulet	Cheval	Mulet	Mulet
3 heures	0,340			0,310		
5 heures		0,325	0,325		0,295	0,295
9 heures	0,340			0,300		
		0,325	0,325		0,289	0,295
24 heures	0,350			0,280		
		0,335	0,335		0,280	0,295
48 heures	0,360			0,260		
		0,340	0,340		0,270	0,280
72 heures Le sérum sent déjà mauvais	0,390			0,173		

2. — *Variations du taux de l'*Uree sanguine *au cours de la Conservation.*

Cette méthode donne donc le taux réel de l'urée sanguine alors que dans les résultats — largement suffisants d'ailleurs aux nécessités de l'investigation clinique — fournis par le procédé courant à l'hypobromite de soude, on retrouve tout le bloc formé par l'urée, les composés azotés non protéïques et même l'azote de l'ammoniaque.

Nous avons fait l'étude comparative de ces deux méthodes au cours du vieillissement du sérum séparé des globules, à la température de la glacière. Nos résultats sont reproduits au tableau VIII.

Cf. page 96

D'après le principe même de la détermination de l' « *indice hypobromite* » de l'urée sanguine, la stabilité de cet indice au cours de la conservation ne saurait nous étonner [111].

Par contre, le taux réel de l'urée déterminé par le microdosage au xanthydrol ne cesse de diminuer dans les mêmes conditions. Cette constatation ne nous surprend guère davantage puisque *à priori,* dans un sérum ne contenant pas d'agents antiseptiques, la fermentation ammoniacale doit avoir son effet sur l'hydrolyse de l'urée et la transformation partielle de celle-ci en carbonate d'ammoniaque.

Cette hydrolyse qui provoque ainsi l'abaissement du taux réel de l'urée se manifeste beaucoup plus lentement sur un sérum conservé à la glacière. Au bout de 24 heures, elle est encore nulle. Tandis qu'au cours du vieillissement à la température du laboratoire la vitesse de décomposition de l'urée sanguine est assez rapide mais irrégulière.

RESUME ET CONCLUSIONS GENERALES

L'ensemble de ce travail permet de dégager les principales conclusions suivantes:

1° Suivant les procédés analytiques employés, la « *Sérine* » et la « *Globuline* » sont susceptibles de fortes variations. L'état actuel de nos techniques chimiques ne peut donc attribuer encore qu'une valeur quelque peu arbitraire aux dénominations que nous donnons aux divers fractionnements protéïques du sérum. Néanmoins, en se tenant dans des conditions opératoires identiques, la détermination des différentes fractions lipo-protéïques du sérum sanguin présente un intérêt clinique réel. Elle aide à fixer les stades et à diagnostiquer l'évolution d'un certain nombre de maladies.

2° Au cours du vieillissement et du chauffage, l'équilibre du complexe lipo-protéïque de Machebœuf est rompu. La « *Sérine* » se révèle avec une stabilité remarquable tandis que la « *Globuline* » se caractérise par une labilité et une instabilité très capricieuse. Cette observation rejoint ainsi le travail de Mme A. Roche [97] sur les variations du poids moléculaire de la globuline dans les mêmes conditions. Les

Lipides qui leur sont associés suivent à peu près la même courbe de variations. D'un côté, ils s'accrochent très énergiquement à la *sérine* alors que de l'autre côté, ils se soumettent au caractère d'instabilité de la *globuline*. Nous avons essayé d'expliquer cette variation en faisant l'hypothèse qu'une partie des phospholipides dont la nature a été étudiée par Marquet [74] pourrait se fixer sur les valences coordinatives de la *globuline*, avant de se précipiter au cours de la conservation. Ces phosphatides altérés ne s'accrochent que dans un sens, uniquement sur les *globulines* labiles; les liaisons rigides de la sérine restent inattaquables.

Cependant, à 37°, les lipides associés à la *sérine* sont légèrement altérés. Cette fluctuation dans notre hypothèse serait peut-être du même ordre que celle observée par Lecomte du Noüy [66] sur la viscosité du sérum en fonction de la température. A la température de la destruction de l'alexine la rupture de l'équilibre lipo-protéïque se manifeste avec une évidence remarquable en faveur de la *globuline*, tandis que les *lipides* qui leur sont associés restent invariables. Cette observation serait de nature à démontrer une fois de plus le rôle de la *globuline* dans la sigma-réaction bien que nous ignorions encore la part respective de responsabilité des sous-fractions de cette même *globuline*.

La seconde partie de notre travail, consacrée à l'étude des produits de désintégration de ces mêmes matières protéïques a montré que :

1° Dans la détermination de l'*Index-Tyrosine* des polpeptides, d'une part la spectrocolorimétrie est supérieure à la colorimétrie et d'autre part, les noyaux hydroxylés tyrosiniques sont également sensibles au réactif

phénolique de Folin, les chaînes latérales hydrocarbonées leucyl et glycyl qui y sont accolées n'exercent aucune influence néfaste. Par contre, la présence dans ce noyau des substitutions métalloïdiques à poids moléculaire élevé trouble l'effet de ce réactif. Par ailleurs, les variations de la Tyrosine non-protéïque et de la Tyrosine polypeptidique au cours de la conservation semblent présenter la même allure que le phénomène de la protidolyse normale signalé par Julien [60].

2° Le microdosage iodométrique de l'urée sanguine par oxydation sulfo-chronique de la dixanthylurée, avec la légère amélioration que nous avons apportée, peut se réaliser fort commodément et avec toute la précision voulue. Dans le domaine pratique, cette détermination doit se faire immédiatement à moins qu'on ne conserve le sérum à la glacière où le taux d'urée reste invariable pendant les premières vingt-quatre heures.

APPENDICE

Sur un microdosage iodométrique de l'*Acétone urinaire* par oxydation sulfo-chromique de la combinaison acétono-mercurique de Deniges

Les dosages de l'acétone connus jusqu'ici se basent en général sur la réaction de Lieben. L'acétone en milieu alcalin fixe une quantité proportionnelle d'iode à l'état d'iodoforme:

$$CH^3 — CO — CH^3 + 6\,I + 4\,Na\,OH =$$
$$= CHI^3 + CH^3 - CO\,O\,Na + 3\,Na\,I + 3\,H^2\,O$$

Cette réaction se fait, soit sur la liqueur acétonique elle-même, soit après isolement de l'acétone par combinaison avec le réactif de Nessler (chloro-iodo-mercurate de potassium) à froid (Gros [41]); ou avec le réactif de Deniges au sulfate mercurique à chaud (Fleury-Awad [41]), ou avec le cyanure de mercure à froid (Scott-Wilson [105]). L'iodoforme formé est évalué ensuite soit par *diaphanométrie* (Jaksh), soit par *gravimétrie* (Kraemer, Deschmüller, Tollens, Salkowsky), soit par *argentimétrie* (Supino, Zoeppel, Argenson [5]; soit par *iodométrie* (Fleury-Awad [41], Schmidt-Hebbel). Par ailleurs, l'acétone est traité avec le *chlorhydrate d'hydroxylamine* et le dosage de l'acide chlo-

rhydrique libéré donne la quantité d'acétone (W. Stepp et W. Engelhardt [106]).

Le dosage colorimétrique au *nitro-prussiate de soude* [32] ne doit pas être retenu à cause de son manque de précision. Nous avons fait également des essais de détermination colorimétrique avec la réaction de Frommer-Emilewcz [34] mais les résultats n'ont pas donné toute la précision voulue.

Au cours de notre étude sur l'oxydation sulfo-chromique nous avons pu constater que la combinaison acétono-mercurique de Deniges s'y prête très bien.

On sait, depuis les travaux de Deniges [32], que le sulfate mercurique en grand excès est susceptible de former avec l'acétone une combinaison renfermant pour 4 molécules d'acétone, 3 molécules de sulfate basique 2 Hg, SO^4, 3 Hg. O, et contenant 0,0585 de son poids d'acétone. Cette combinaison n'est pas stable; longtemps lavée ou desséchée, elle perd une molécule d'acétone et répond alors à la formule 2 Hg SO^4, 3 Hg O, CO $[CH^3]^2$ ou bien:

$$SO^4 < \begin{matrix} Hg - O - Hg \\ \diagdown \\ Hg \end{matrix} \quad O, C^3 H^6 O$$

$$SO^4 < \begin{matrix} \\ \diagup \\ Hg - O - Hg \end{matrix}$$

renfermant 0,045 de son poids d'acétone. Elle a l'aspect d'une poudre cristalline blanche, constituée par des dodécaèdres très petits.

L'action oxydante sulfo-chromique la détruit totalement vers 110°. L'acétone est donc brûlée intégralement sous forme de CO^2 et H^2O. On déterminera par iodométrie la quantié de chromate qui n'a pas réagi et on déduira facilement ainsi la quantité d'acétone correspondante.

Réactif de DENIGES*:* Oxyde rouge de mercure 5 gr.; acide sulfurique, 20 cm³; eau, 10 cm³.

Les autres réactifs sont pareils à ceux utilisés pour le microdosage de l'urée sanguine par la méthode au xanthydrol.

Mode opératoire. — On sait le caractère fugace de l'acide acétyl-acétique. Aussi l'acétone urinaire comprend en réalité l'acétone préexistante dans l'urine plus l'acide acétylacétique qui se décompose secondairement et instantanément en acétone par chauffage de l'urine. Son dosage doit toujours se faire sur le distillat de l'urine [78].

1° *Distillation de l'urine et obtention de la combinaison acétono-mercurique.*

Dans un petit ballon de 10 cm³, mesurer exactement 2 cc. d'urine et 2 cc d'eau. Distiller doucement en présence de II gouttes d'acide sulfurique concentré; 2 grains de pierre ponce et une trace de savon pour éviter la formation de mousses surtout si l'urine contient de l'albumine et du glucose.

Recueilir 2 cc. de distillat dans un petit tube à centrifugation de 10 à 15 cc. et ajouter 2 cc. de réactif de DENIGES. Bien mélanger, boucher le tube et porter au bain-marie déjà bouillant à gros flocons pendant quinze à vingt minutes. La réaction sera terminée lorsque la liqueur surnageante devient claire. A ce moment, sortir le tube du bain-marie et le refroidir sous un courant d'eau. Laisser encore dans un bain d'eau froide pendant 5 minutes et ajouter 1 cc. 5 d'alcool à 95°. En effet, ce précipité légèrement soluble à chaud se reforme intégralement à froid, en milieu alcoolique. Le réaction de DENIGES est sans action sur l'alcool traité exactement dans les mêmes conditions.

Bien agiter le tube en le roulant entre les mains. Laisser reposer 15 minutes, tout en répétant l'agitation de temps en temps. Centrifuger ensuite pendant 5 minutes et laver le précipité deux fois avec 2 cc. d'eau distillée chaque fois. La décantation se fait facilement sans aucun risque de perte, en observant les précautions que nous avons signalées au sujet du microdosage au xanthydrol de l'urée sanguine. Si le précipité est peu important, faire le lavage avec de l'alcool éthylique au 1/3. Le précipité s'agglomère mieux et la centrifugation se fait plus facilement.

Porter ensuite le produit de la centrifugation à l'étuve à 100-110° pendant 15 à 20 minutes pour chasser toute trace d'alcool qui pourrait fausser par la suite l'oxydation sulfochromique.

2° *Oxydation.* — Laisser refroidir le tube et ajouter 3 cc. *exactement mesurés* de bichromate de potasse $\frac{N}{3}$. Mélanger avec un petit agitateur pour détacher le précipité aggloméré au fond du tube. Plonger alors le tube dans un bain d'eau froide puis, tout en agitant très soigneusement, verser par *petites quantités*, surtout au début, 6 cc. d'acide sulfurique concentré pur. Changer l'eau du bain et laisser encore refroidir 3 minutes.

Porter ensuite le tube dans un bain-marie bouillant contenant environ 20 grammes p. 100 de chlorure de sodium (Le point d'ébullition sera ainsi porté vers 110°). Y laisser pendant 10 à 15 minutes tout en mélangeant énergiquement à l'aide de l'agitateur.

Refroidir et transvaser le produit de l'oxydation dans un bécher de 500 cc. Laver le tube à centrifugation avec 100 cc. d'eau et ajouter 2 cc. d'une solution d'iodure de potassium à

20 %. Laisser en contact 3 minutes et diluer fortement après avec environ 300 cc. d'eau distillée. Titrer l'excès d'iode par une solution d'hyposulfite de sodium $\frac{n}{20}$. [Se reporter aux renseignements donnés sur l'oxydation de la dixanthylurée]. Soit *n'* le nombre de cc. d'hyposulfite versé.

Faire un témoin, *exactement dans les mêmes conditions*, soit *n* cm^3 d'hyposulfite versé.

Calcul. — On sait que:

$$CH^3 - CO - CH^3 + 8\,O = 3\,CO^2 + 3\,H^2O$$

De sorte que 1 cm^3 d'hyposulfite $\frac{n}{20}$ correspond à 0 mgr. 18125 d'acétone.

Soit [n-n'] × 0,182 = mgr. d'acétone contenue dans la prise d'essai.

Nous avons vérifiée cette méthode avec des solutions titrées d'acétone à 0 gr. 500 et 1 gramme par litre. L'erreur relative commise n'a jamais dépassé 5 % ; elle oscille plutôt entre 2 et 3 %.

Remarque. — La prise d'essai doit contenir *au moins* 1 *milligramme d'acétone*. L'importance du précipité permet de s'en rendre compte. Sinon, on fait le dosage sur un volume plus important de distillat urinaire.

Nous signalons cette technique uniquement en raison de sa portée théorique. Mais dans la pratique, la méthode chronométrique de Deniges, simple, rapide et commode, aura toujours la supériorité [33].

BIBLIOGRAPHIE

[1] Achard (Ch.), Grigaut (A.), Codounis (A.). — Les variations pathologiques de la pression osmotique des protéïnes et de la composition protéïnique du sérum sanguin. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1930, 12; 417-440.

[2] Achard (Ch.), Bariety (M.), Codounis (A.). — L'équilibre protéïnique du sérum dans la tuberculose pulmonaire. Sa valeur pronostique. *Presse médicale*, n° 93, 1929, p. 1509.

[3] Achard (Ch.), Grigaut, Codounis, Boutroux. — Sur le quotient albumineux du sérum. *Bull. Acad. Méd.* 1929-101-725.

[4] Allen (F.-W.) et Luck. — The oxydation of dixanthyl urea by means of the dichromate reaction. A new method for determining urea. *Journ. of. biol. Chem.* 1929, 82; 693-701.

[5] Argenson (G.). — Sur le dosage de l'acétone dans les urines. *Bull. Soc. Chim. Paris*, 1896 xv, 1.055.

[6] Auguste (Ch.). — La réaction de Bordet-Wassermann dans le sérum débarrassé de la fraction précipitable par l'acide chlorhydrique. *Ann. Inst. Pasteur* 1936, 56; 17-45 et *Bull. Acad. Méd.* 30 octobre 1934.

[7] Avellar de Loureiro. — Nouvelle technique de précipitation pour l'étude néphélométrique des protéïnes du sérum. *C.R. Soc. Biol.* 1930, 104, 921.

[8] Baudoin (A.) et Benard (H.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1922, 4; 454-473.

[9] Bircher et Mac-Farland. — Le taux de la globuline contenu dans le sérum sanguin des syphilitiques. *Arch. of dermatology and Syphilology*, Chicago, février 1922.

[10] Bory (L.). — Rôles respectifs de la Sérine et de la Globuline dans la sigma-réaction. *C.R. Soc. Biol.* 1918; 247.

— Sur la nature des composants de la sigma-réaction. *C. R. Soc. Biol.* 1918; 128.

[11] Bory et Guerithault. — Teneur comparée des sérums normaux et syphilitiques en sérine et globuline. *Soc. méd. des Hôp.*, 31 juin 1919.

[12] Boivin (A.). — Nouvelle méthode micro-analytique du dosage de l'urée dans le sang. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1928-8; 456.
— Une application du microcarbone de Nicloux au dosage de l'urée par l'intermédiaire de la dixanthylurée. *Bul. Soc. Chim. Biol.* 1928-10; 686-697.
[13] Bonnot (A.). — *Thèse Sciences*, Paris 1934.
[14] Bouchara. — *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1930-12; 994-1.000.
[15] Breton (A.). — Influence du vieillissement sur les sérums soumis à la réaction de Vernes à la résorcine. *C. R. Soc. Biol.* 1928-1; 1.429.
[16] Buglia et Polimanti. — Variazioni fisico chemiche del siero di sangue durante l'invecchiamento. *Arch. di Fisiologia*, 1906-4; 56.
[17] Cabanes (E.). — Sur les méthodes de dosage optique des solutions colorées. *Thèse Pharmacie*, Montpellier 1931.
[18] Canals (E.) et Cabanes (E.). — A propos des essais colorimétriques. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1922-xiv; 238-262.
[19] Canals (E.) et Peyrot (P.). — Techniques physiques appliquées à la Chimie et à la Biologie. *A. Dubois et R. Poulain Editeurs.* Montpellier.
[20] Chalier (J.) et Chevallier (A.). — *C.R. Soc. Biol.* 1924-1; 224.
[21] Chibnall (A.) et Channon (H.-G.). — The ether soluble substances of cabages leaf cytoplasm. vi. Summary and general conclusions. *Bioch. Journ.* T. 23; 176-184.
[22] Cordebard (H.). — Vérification de la pureté et titrage des composés organiques complètement oxydés par le mélange chromique. *Thèse Pharmacie* Nancy, 1922.
— Méthode de dosage volumétrique de l'urée par oxydation de la xanthylurée. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1928-10; 461.
[23] Cueni (J.). — Le métabolisme lipido-protéidique chez le sujet normal et dans les différentes affections d'hyperlipémie. *Thèse Pharmacie,* Strasbourg 1934.
[24] Cullen (G.-E.) et Van-Slyke (D.-D.). — Dosage de la fibrine, de la globuline et de l'azote albuminoïde du plasma sanguin. *Journ. Biol. Chem.* 1920-41; 587-597.
[25] Cuny (L.) et Robert (J.). — Emploi de l'oxydation sulfochromique pour le microdosage iodométrique de l'urée sanguine. *Journal de Pharm. et Chim.* 1932-15 7-17 et *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1931-13; 1167-1177.
— Microdosage iodométrique de l'urée sanguine par oxydation sulfoiodique. *Journ. Pharm. et Chim.* 1930-(8)-11; 338-346 et *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1930-12; 171-193.
[26] Cristol (P.). — Précis de chimie biologique et médicale. *Masson et Cie,* 1935.
— Etude sur la désalbumination du sang et des humeurs en vue du dosage de l'azote total non-protéique et de son

exploration en physiopathologie. 1 *vol* 122 *p.; Maloine*, Paris; *Valat*, Montpellier, 1926.

Nouvelles études sur la désalbumination du sang en vue du dosage de l'azote total non-protéïque et de la détermination de l'indice de polypeptidémie. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1929-II; 92-110.

— *Thèse Médecine Montpellier*, 1926.

[27] Cristol (P.) et Monnier. — *Bull. Soc. Chim. de France, Section de Montpellier.* Mai 1937, t. 4, 808-809.

[28] Cristol (P.) et Puech (A.). — Peut-on mettre en évidence la présence des polypeptides dans le sang? *Bull. Soc. Sc. Méd. et biol. de Montpellier et du Languedoc Méd.*, 1925-7; 48-52.

— Troubles du métabolisme azoté intermédiaire en pathologie. Recherches expérimentales et cliniques sur les polypeptides du sérum sanguin. *Acad. des Sciences de Montpellier*, 1929.

[29] Cristol, Puech et Monnier. — Dosage comparé des albumines plasmatiques par azotométrie et par réfractométrie. *Soc. Sc. méd. de Montpellier*, juillet 1929.

[30] Cristol (P.), Monnier (P.) et Julien (L.). — Sur la protéïdolyse aseptique lente. *Soc. Chim. de France, section de Montpellier, séance du* 11 *juin* 1933.

[31] Delage (B.). — Liaisons lipides-protides et vieillissement du sérum sanguin. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1936-17; 1.304-1.310.

— Contribution à l'étude des liaisons lipides-protéïdes dans le sérum sanguin. Analyse des facteurs physico-chimiques de l'extractibilité des lipides sériques par l'Ether en présence de différentes substances. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1936-17; 1603-1612.

— Contribution à l'étude de la stabilité des liaisons lipoprotéïdiques dans le sérum sanguin. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1935-17; 927-937.

[32] Denigès (G.). — Sur quelques combinaisons obtenues avec certaines fonctions organiques. *Bull. Soc. Pharm. de Bordeaux*, 1897; 331 et *C. R. Acad. des Sciences* 1898, 5 décembre; et *Journal de Pharm. et de Chim.* 1899, 1er janv.

— *C.R. Acad. des Sciences* 1899, t. 128.

— Sur la précipitation quantitative de l'Acétone. *Bull. Soc. Pharm. de Bordeaux*, 1899; 252.

— Sur le dosage de l'Acétone à l'aide du nitro-prussiate de soude. *Id.* 1907; 161.

Dosage de l'acétone urinaire par volumétrie et par chronométrie. *Id.* p. 163.

— Détermination de l'acétone urinaire par distillation. *Id.* 1910, p. 102.

— Etude de l'acétone dans l'urine et réaction de Legal. *Id.* 1910, p. 97.

— Précis de Chimie analytique.

[33] Denigès (G.) et Simonot (E.). — Détermination rapide de l'acétone par la méthode chronométrique. *Bull. Soc. Pharmac. de Bordeaux*, 1914, 11.

[34] Derrien (E.) et Fontès (G.). — Chimie Biologique médicale. 3e éd. *J.B. Baillière et Fils éditeurs* (1 vol. 455 p.).

[35] Exton (W.-C.) et Rose (A.-E.). — La répartition clinique des protéïdes sanguins par *scopométrie*. *Journ. biol. chem.* 1932, t. 97. Proc. xxvii.

[36] Von Farkas. — G. Studien über den Kolloidos motischen Druck des serums. *Zeits. f. die. ges. exp. Mediz;* Bd. 53, p. 666; 1927.

[37] Fiessinger (N.), Olivier (H.-R.), Herbain (M.). — Diagnostics biologiques. *Editions médicales, Norbert Maloine*, Paris, 1929.

— Indice de désamination sanguine comme épreuve d'exploration fonctionnelle du foie. *Soc. Méd. des hôp.*, 19 nov. 1928-5; n° 35.

38] Filinski et Proszowski. — *Archivum Medycygny. Wewnetrny*, 1923-1; n° 1.

[39] Fleury (P.). — Dosage de l'acétone et son application à l'urine *Journ. Pharm. et Chim.* 1926-3-409.

— Fiches techniques de Chimie Biologique. *Edit. Vega*, Paris, 1934.

[40] Fleury (G.). — Réflexions sur la colorimétrie. *Bull Soc. Chim. Biol.* 1922, iv, 223.

[41] Fleury (P.) et Awad (J.). — Nouveau procédé de dosage de l'acétone. Son application à l'urine. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1926-8; 550.

[42] Fontès (G.) et Thivolle (L.). — Sur la préparation du réactif phosphomolybdique. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1926-8; p. 982-983.

[43] Fosse (R.). — L'Urée. 1 vol. 303 p. *Les Presses universitaires de France*, Paris, 1928.

[44] Fosse (R.), Robyn (A.) François (F.). — *C. R. Acad. des Sc.* 1914, t. clix, p. 367.

[45] Girard (R.). — Recherches sur les variations du rapport globuline / sérine du sérum sanguin au cours de quelques états pathologiques. *Thèse Médecine*, Paris 1924.

[46] Goiffon et Handiquent. — Mesure des albumines complexes par leur « *erreur de protéïnes* » . *C.R. Soc. Biol.* 1927-97; 311-313.

[47] Goiffon et Spaey. — Mesure de l'Index-Tyrosine des polypeptides sériques. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1934, t. 16; 1675.
— Méthode colorimétrique de mesure des polypeptides du sérum. *C.R. Soc. Biol.* 1934, 1, 711.

[48] Govaerts (P.). — Influence de la teneur du sérum en albumines et en globulines sur la pression osmotique des protéïnes et sur la formation des œdèmes. *Bull. Acad. royale de Med. Belge,* 1927-7; 356.
- Id. 1924, n° 3.
— *C.R. Soc. Biol.* 1923-89; 678 et
— Id., 1925-93; 441.

[49] Grigaut (A.). — Etude de la dissociation du complexe lipoprotéïque du sérum par l'alcool. Application à l'extractraction des lipides, des phospho-aminolipides et du cholestérol du sérum sanguin. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1935-17; 1031-1039.
— *C. R. Soc. Biol.* 1912-72; 912.

[50] Greenberg (D.-M.). — Détermination colorimétrique des protéïnes du sérum. *Journ. biol. chem.* 1929-8; 545-550.

[51] Guérin (J.). — Contribution à l'étude du dosage colorimétrique de la Tyrosine et du Tryptophane dans les matières protéïques. *Thèse de Diplôme Pharmacien Supérieur,* Paris 1932.

[52] Guillaumin (Ch.-O.), Wahl (R.), Mlle Laurencin (L.). — *Bull- Soc. Chim. Biol.* 1929-11; 387-399.

[53] Hahn (F.L.). — Les réaction qui se produisent au cours de la détermination iodométrique des chromates. *J. Amér. Chem. Soc.* 1935 (4)-57; 614-616.

[54] Hammarsten (O.). — Ergebnisse der Physiologie 1 330 (1902).

[55] Hardy et Gardinier. — *The Biochemical Journal,* 197 xxi, p. 130.

[56] Henley (R.-R.). — Changes in the protéins et and the gelification of formalized blood serum. *Jour. of biol. chem.* 1923-57; 139-151.

[57] Howe (P.-E.). — Emploi du sulfate de sodium pour précipiter les globulines dans le dosage des protéïnes du sang. *J. of biol. chem.* 1921-49; 93-107.
— The determination of protéins in blood. A micro method. *Journ. of biol. chem.* 1921-49; 109-113.

[58] Hugounenq (L.) et Morel (A.). — Sur l'emploi du réactif de Fosse (xanthydrol) pour le dosage de l'urée dans le sang et les liquides de l'économie animale. *C. R. Soc. Biol.* e913, t.lxxiv, 1055.

[59] Jeanbrau et Cristol. — La valeur pronostique de l'étude des divers composés azotés non-protéïques du sang dans

les maladies de l'appareil urinaire. LXIV^e *Congrès des Sociétés Savantes, Clermont-Ferrand.*

[60] JULIEN (L.). — L'auto-hemo-protidolyse chez l'homme normal et le néphrétique. Ses relations avec la pathogénie de l'intoxication urémique. *Thèse Médecine*, Montpellier 1935.

[61] KAPSENBERG (G.). — Recherches sur le rôle de la globuline dans la réaction de WASSERMANN avec contribution à la technique de la Dialyse et à l'exécution de la réaction de WASSERMANN. *Annales de l'Institut Pasteur* 1921-35, p. 338-362 et 648-694.

[62] KNIPPING (H.-W.) et KOWITZ (H.-L.). — *Zeit. physiol. Ch.* 1924-135; 84-94.

[63] KAYSER (F.). — Dosage rapide des protéïnes du sérum sanguin. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1930-12; 533-537.

[64] KUMAGAWA et SUTO. — *Biochem. zeitschr.* 1908-8; 213-250-340-347.

[65] LANGMUIR. — *Journ. Amer. Chem. Soc.* 39, 1848 (1917).

[65 *bis*] LIEGEOIS (F.). — L'Index-Tyrosine des polypeptides sanguins chez le Chien, le Cheval et le Porc, à l'état normal. *C.R. Soc. Biol.* 1937, t. 124, p. 569.. Egalement: *C.R. Soc. Biol.* 1937, t. 124, p. 571 et 572.

[66] LECOMTE DU NOÜY. — Sur la viscosité du sérum sanguin en fonction de la température. *C.R. Soc. Biol.* 1927-1; 1203.

— Sur les variations de la viscosité du sérum sanguin en fonction de la température. *C.R. Soc. Biol.* 1924-1; 168.

— Recherches sur les équilibres ioniques du sérum. Relations entre la concentration des sels et l'équilibre albumine-globuline. *C.R. Soc. Biol.* 1931-106; 85.

[67] LEFAUX (R.). — Nouvelle mesure de l'Index-Tyrosine des polypeptides sériques. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1935-17; 1822.

— Etude de la réation Xantho-protéïque. Son application à la mesure de l'index-tyrosine des polypeptides sériques et au dosage des phénols sanguins. *Journ. Pharm. et Chim.* 16 avril 1936; 437.

]68[LŒPER, FORESTIER et TONNET. — L'albuminose paradoxale du sérum cancéreux. *C. R. Soc. Biol.* 1920, 10 juillet et *Presse médicale* 1921.

[69] LUNDBERG (E.G.). — Sur la photolabilité du complément. *C. R. Soc. Biol.* 1921-2; 758.

[70] MACHEBŒUF (M.-A.). — Recherches sur les lipides, les stérols et les protéïdes du sérum et du plasma sanguin. *Th. Sciences*, Paris 1928.

— *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1929-11; 268-293.

— Id. 1931-13; 736-744.

[71] Machebœuf et Sandor. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1932, xiv, 1168-1190.
— Id. 1931-13; 745-757.
— *C.R. Soc. Biol.;* 1932-194.
[72] Machebœuf et Wahl. — Recherches biologiques sur la néphrose lipoïdique. *Bull. Soc. Chim. Biol;* 1931-13; 486-503.
— Id., 1931-13; 511-515.
— Id. 1931-13; 736-744.
[73] Machebœuf, Wahl et Sandor. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1931-13; 504-510.
[74] Marquet (F.). — Recherches sur le poids moléculaire de la sérum-albumine et sur le vieillissement du sérum. *Thèse Pharmacie,* Marseille, 1935.
[75] Mascré et Herbain. — Influence du formol sur la précipitation des albumines sériques. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1930-12; 978-993.
[76] Matsumura (S.). — Précipitation de l'albumine du sérum par le chlorure cuivrique. *Koll. zeit;* 1923-32; 115-118.
[77] Martens (R.). — Le double-azote. De la nature des éléments qui le composent. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1936, p. 1551-1567
[78] Mestrezat (W.). — Techniques courantes de chimie clinique. *Masson et Cie éd.*, 1930, 1 vol. 263 p.
[79] Merklen (P.), Lebreton (E.) et Aduot (A.). — Méthodes de dosage dé l'albumine et de la globuline sériques sans emploi d'électrolytes précipitants. *C. R. Soc. Biol.* 1931-107-758.
[80] De Myttenaere et Bessemans (A.). — Dosage de la Sérine et de la CO^2-Globuline dans le sérum. Un procédé rapide et suffisamment exact. *C. R. Soc. Biol.* 1922; 87-800.
[81] Moitessier (J.) et Roche (A.). — Guide de travaux pratiques de Chimie biologique et médicale. *Lons-le-Saunier, Imprimerie et Lithographie Maurice Declume,* 1935.
[82] De Nador (E.), Nikititch. — *C.R. Soc. Biol.* 1925-92; 254.
[83] Nicloux (M.) et Welter (G.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1922-4; 128-142.
— *C.R. Soc. Biol. Strasbourg,* 1922 (ii), 86-161.
[84] Perrier (R.). — Cours élémentaire de Zoologie. *Masson* 1925.
[85] Peyre (E.). — *C.R. Soc. Biol.* 1921; 536.
[86] Piettre (M.) et Vila (A.). — Séparation des protéïnes du sérum. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1921-3; 483-489.
[87] Proca. — Sur la séparation des globulines du sérum à basse température. *C.R. Soc. Biol.* 1924190; 721.
[88] Pohorecka (Mme) et Lelesz. — Le microdosage de l'urée dans 0 cc. 1 de sang. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1925-7; 1085.
— Id. 1926-8; 178.
[89] Polonowski (M.). — Sur le dosage colorimétrique des poly-

peptides par l'hydrate de triceto-hydrindène (ninhydrine). *C.R. Soc. Biol.* 1935-120; 28-29.

[90] Polodowski et Auguste. — *C.R. Soc. Biol.* 1922-86; 1027.

[91] Puech (A.). — *Montpellier Médical*, 1925-47; 337-345.

— Etude des albumines du sérum et recherches sur les modifications de leur taux dans les maladies par la viscosimétrie et la réfractométrie. *Thèse Médecine Montpellier*, 1924.

[92] Rabinowitch (I.-M.). — *Journ. biol. chem.* 1930. Proc. lvii, t. 87.

[93] Reiss. — *Thèse Strasbourg* 1902.

[94] Reines (L.) et Kohp (H.). — Isolement et dosage de la globuline du sérum par électrolyse. *Koll. zeit.* 1928-46; 99-107.

[95] Robertson. — *J. biol. Chem.* 1915 xxii, 233.

[96] Roche (A.). — La plasticité des protéïdes et la spécificité de leurs caractères. Exposés de Biophysique. III. Hermann et Cie, éditeurs.

[97] Roche (A.) et Bracco (J.). — Pression osmotique et poids moléculaire des globulines du sérum. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1934-xvi; 1479-1497.

[98] Roche (A.) et Marquet (F.). — Recherches sur le vieillissement du sérum. *C.R. Soc. Biol.* 1935. p. 1147-1149.

[99] Ronchèse (A.-D.). — Procédé de conservation de l'activité du complément. *C.R. Soc. Biol.* 9119; 193.

[100] Rusznyak (St). —Détermination néphélométrique du quo- albumine tient ————. globuline *Biochem. zeit.* 1922-133; 370-372.

[101] Rusznyak et Barat. — *Id.*, 1923-141; 476-478.

[102] Rowe (A.-H.). — Teneur en albumines et en globulines du sérum sanguin de l'homme normal ou atteint de syphilis, pneumonie ou autres affections. *Archiv. of intern. med.* oct. 1916.

[103] Sanchez (J.-A.). — Dosage colorimétrique de l'urée. *Monitor Farmacia*, 1936-47; n° 1258, 77-81, 20 février.

[104] Sandor (G.). — Le problème des Protéïdes. *G. Doin et Cie, éditeurs*, Paris.

— Contribution à l'étude des antigènes des microbes pathogènes. *G. Doin et Cie, éditeurs*, Paris.

[105] Scott-Wilson. — Dosage de l'acétone. Combinaison à base de cyanure de mercure. *Journ. Phys.* 1911, xlii, 414.

[106] Stepp (W.) et Engelhardt (W.). — Dosage de l'acétone par le chlorhydrate d'hydroxylamine. *Bioch. z.* 1920, ii, 8-16.

[107] Sartory (A et R), Hufschmitt, Meyer (J.). — Contribution à l'étude du métabolisme protidolipidique dans les ma-

ladies infectieuses. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1936, décembre, t. XVIII, p. 1842-1849.

[108] SARTORY, MEYER, HUFSCHMITT, CUENY. — Psoriasis et métabolisme des corps gras. *Congrès de l'A.F.A.S.*, 1934.

[109] TAGE, KEMP. — *C.R. Soc. Biol.* 1927-1; 559-562.

[110] YOUNG. — *Proc. Roy. Soc. London*, 1922-15; 93.

[111] ZEIN (I.). — Les analyses chimiques du sang en clientèle. Influence du temps et de la température sur les constituants azotés du sang. *Thèse Pharmacie*, Montpellier 1936.

TABLE DES MATIERES

Pages

AVANT-PROPOS 9

INTRODUCTION 11

PREMIERE PARTIE

Chapitre I. — APERÇU GENERAL SUR LES PROTEÏDES DU SANG.

I. Valeur pathologique du quotient albumineux sanguin 15

II. Modifications d'ordre physico-chimique du sérum au cours des séro-réactions 20

III. Caractères physico-chimiques de la Sérine et de la Globuline du Sang 24

IV. Influence du Vieillissement et du Chauffage sur l'état physico-chimique du sérum sanguin 30

Chapitre II. — TECHNIQUES DE DOSAGES DES PROTÉÏDES DU SANG

A. — Méthodes Physiques et Physico-Chimiques . . 32

B. — Méthodes Chimiques 35

1. *Méthodes Azotimétriques* 35

2. *Méthodes Pondérales* 37

Chapitre III. — Travaux personnels sur le complexe lipo-protéïque du serum sanguin

1. — Mesure de l'Azote-Sérine et de l'Azote-Globuline du plasma d'après la méthode de Howe 41

2. — Dosage pondéral de la Sérine-Globuline et des Lipides associés d'après la méthode de Macheboeuf . . 45

3. — Etude comparative du quotient $\frac{\text{sérine}}{\text{globuline}}$ obtenu par gravimétrie et du rapport $\frac{\text{N-Sérine}}{\text{N-Globuline}}$ 54

4. — Détermination de la Tension Osmotique des Protéïnes chez quelques espèces animales d'après la quantité de sérine et de globuline obtenue par la méthode pondérale 58

5. — Etude du complexe lipo-protéïque de Macheboeuf chez quelques espèces animales et comparaison de nos résultats avec ceux donnés par d'autres auteurs. . 59

6. — Influence du *Vieillissement* sur la constitution du complexe lipo-protéïque 61

7. — Influence du *Chauffage* sur la constitution du complexe lipo-protéïque 65

8. — Conclusions 66

DEUXIEME PARTIE

« Index-Tyrosine » des Polypeptides seriques

I. — Détermination colorimétrique de l'*Index-Tyrosine* des Polypeptides 69

A. — Méthode de Lefaux 72

B. — Méthode de Goiffon-Spaey 72

1° Comportement de quelques noyaux hydroxylés-tyrosiniques en présence du réactif des « *phénols* » de Folin 75

2° Emploi du spectro-colorimètre de Duboscq-Pellin pour la mesure de l'*Index-Tyrosine* des polypeptides 77

II. — Valeur de l' « *Index-Tyrosine* » des Polypeptides chez quelques espèces animales, suivant la méthode de Goiffon.

Variations de cet « *Index* » au cours du *vieillissement* et du *chauffage* 80

TROISIEME PARTIE

I. — Sur une *amélioration* du microdosage iodométrique de l'*Urée sanguine* par oxydation sulfo-chromique de la dixanthylurée 86

II. — Variations du taux réel de l'urée sanguine au cours de la conservation 97

Resume et Conclusions generales 98

Appendice. — Sur un microdosage iodométrique de l'*Acétone urinaire* par oxydation sulfo-chromique de la combinaison acétono-mercurique de Denigès 101

Bibliographie 106

En ma qualité de Censeur de tour, j'ai lu la Thèse ayant pour titre :

« Les Variations de quelques constituants azotés du sérum sanguin. [Etude du complexe lipo-protéïque]. »

par M. NGUYEN-TRUNG HUY.

Je pense que la Faculté peut en permettre l'impression.

Montpellier, le 12 juin 1937,

Le Professeur,
M. MOUSSERON.

Vu :

Montpellier, le 14 juin 1937

Le Doyen,
A. ASTRUC.

Vu et permis d'imprimer :
Montpellier, le 16 juin 1937

Le Recteur,
TAILLIART.

MONTPELLIER
IMPRIMERIE DE LA PRESSE
3, Rue Jardin-Martel

—

1937